

No d'ordre A. O. 3501

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Jacqueline BRAUNWALD

licenciée ès-sciences
Attachée de recherches au CNRS

**THERMOSENSIBILITÉ DU DÉVELOPPEMENT DE DIFFÉRENTES
SOUCHES DU VIRUS DE LA VACCINE - ÉTUDE DE L'INHIBITION
DE LA REPLICATION DU DNA D'UN MUTANT "FROID" A TEMPÉRATURE
SUPRA - OPTIMALE**

Soutenue le 4 Juillet 1969 devant la Commission d'Examen.

MM. L. HIRTH

Président

C. JUNGWIRTH

J. P. EBEL

A. KIRN

} Examinateurs



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553609_0026

No d'ordre

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES

par

Jacqueline BRAUNWALD

licenciée ès-sciences
Attachée de recherches au CNRS

**THERMOSENSIBILITÉ DU DÉVELOPPEMENT DE DIFFÉRENTES
SOUCHES DU VIRUS DE LA VACCINE - ÉTUDE DE L'INHIBITION
DE LA REPLICATION DU DNA D'UN MUTANT "FROID" A TEMPÉRATURE
SUPRA - OPTIMALE**

Soutenue le 4 Juillet 1969 devant la Commission d'Examen.

MM. L. HIRTH

Président

C. JUNGWIRTH

J. P. EBEL

A. KIRN

} Examineurs



U N I V E R S I T E D E S T R A S B O U R G

FACULTE DES SCIENCES DE STRASBOURG

Doyen

Professeur VIVIEN J. H.

Doyens Honoraires

MM.

KIRRMANN A.
LACROUTE P.
MARESQUELLE H. J.
MILLOT G.

Professeurs Honoraires

DE BEAUCHAMP P.

BOISSELET L.

CARTAN H.

CERF G.

CHABAUTY C.

CHRETIEN A.

DENY J.

EHRESMANN Ch.

FRECHET M.

Mle

GILLET S.

MM.

HEE A.

HOCART R.

KIRRMANN A.

LEMEE G.

L'HERITIER P.

LICHNEROWICZ A.

NEEL L.

SADRON Ch.

TERROINE E.

VILLAT H.

WEISS H.

WOLFF Et.

YVON J.

Maître de Conférences

Honoraire

WEIL R.

PROFESSEURS

MM.

MARESQUELLE H. J.	T.	Biologie végétale
FORESTIER H.	T.	Chimie générale
ROTHER J.	T.	Physique du Globe
LACROUTE P.	T.	Astronomie
VIVIEN J. H.	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
MAILLARD A.	T.	Physicochimie du Pétrole
GORODETZKY S.	T.	Physique générale et Physique nucléaire
SACKMANN L.	T.	Mécanique des Fluides
BYE J.	T.	Chimie Physique
LOMBARD R.	T.	Chimie organique
M ^{le} M. PEREY	T.	Chimie nucléaire
GOLDSZTAUB S.	T.	Minéralogie et Pétrographie
JOLY P.	T.	Biologie générale
BENOIT H.	T.	Physicochimie macromoléculaire
CUER P.	T.	Physique générale et physique corpusculaire
MILLOT G.	T.	Géologie et Paléontologie
LECOLAZET R.	T. T. P.	Physique du Globe
SAUCIER H.	T. T. P.	Minéralogie
ROHMER R.	T.	Chimie minérale
M ^{le} GAGNIEU A.	T. T. P.	Botanique
NIKITINE S.	T.	Physique générale
STUTINSKY F.	T.	Physiologie générale
WURTZ B.	T. T. P.	Chimie biologique
BRENET J.	T.	Electrochimie
OURISSON G.	T. T. P.	Chimie
COCHE A.	T. T. P.	Physique nucléaire
CERF R.	T.	Physique générale
FRENKEL J.	T. T. P.	Mathématiques
TAGLAND P.	T.	Physique
LONGHAMP J. P.	T. T. P.	Physique
DELUZARCHE A.	T. T. P.	Chimie

MM.

DONNET J. B.	T. T. P. Chimie Physique
ARMBRUSTER R.	T. T. P. Physique
ROCHE A.	T. T. P. Physique du Globe
HIRTH L.	T. Microbiologie
SIGOT A.	P. S. C. Zoologie
FUCHS A.	T. Mécanique rationnelle
GALLMANN A.	T. T. P. Physique
MIALHE P.	T. T. P. Physiologie animale
EBEL J. P.	T. Chimie biologique
PARROD J.	T. T. P. Chimie
WEY R.	T. T. P. Chimie
Mme D. MAGNAC	T. T. P. Physique
DAUNE M.	P. S. C. Physique
ADLOFF J. P.	T. T. P. Chimie nucléaire
BERNARD D.	T. T. P. Méthodes mathématiques de la physique
DANIEL E.	T. Physique expérimentale
CHEVALLIER P.	T. Physique
GREMILLARD J.	T. T. P. Mécanique des Fluides
CARTIER P.	T. Mathématiques
REEB G.	T. Topologie
CHAUVIN R.	T. Psychophysiologie
WUCHER J.	P. S. C. Physique
BRINI M. (Mme)	P. S. C. Chimie
BARO R.	P. S. C. Physique
DURANTON H.	P. S. C. Botanique
WEISS R.	T. T. P. Chimie
FEDERLIN P.	T. T. P. Chimie
LERAY J.	P. S. C. Physique
SCHWING J. P.	P. S. C. Chimie
SIESKIND M.	P. S. C. Physique
MONSONEGO G.	T. Physique théorique
GABRIEL P.	T. T. P. Mathématiques
WIPPLER C.	T. Physicochimie des Hauts Polymères industriels
MEYER P. A.	T. T. P. Mathématiques
WEILL G.	P. S. C. Physique
BLOCH J. M.	T. Chimie
CLAUSS A.	P. S. C. Chimie

MM.

FOLLENIUS
LUCAS J.
THIEBOLD J. J.
GLAESER G.
J. H. WEIL
FOATA D.

P. S. C. Zoologie
P. S. C. Géologie
P. S. C. Biologie animale
T. Mathématiques
P. S. C. Chimie biologique
P. S. C. Mathématiques

PROFESSEURS ASSOCIES

MM.

BANDERET A.
CLELAND R.
PEROLD G.
SAMPSON J.

E. A. H. P.
Physique
Chimie
Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES

MM.

DANAN H.
Mme WINTER Chr.
EBERHART J. P.
Mme CAGNIANT D.
FERNIQUE X.
STREITH J.
GAUTIER F.
SUTTER G.
LEHN J. M.
ROBERT Cl.

Physique
Physique
Minéralogie
Chimie
Mathématiques
Chimie
Physique propédeutique
Physique électronique
Chimie
Physique

MM.

LACROUTE Fr.	Biologie végétale
GIRARDIE A.	Biologie animale
GOUNOT M.	Botanique
DEHAND J.	Chimie minérale
PRADINES J.	Mathématiques
BECKER F.	Physique mathématiques
KAROUBI M.	Mathématiques
MIGNOT A.	Mathématiques appliquées
VOLTZ R.	Physique théorique
MICHARD A.	Géologie
GIRAUD J. M.	Mathématiques
BOULANGER Y.	Chimie biologique
DACUNHA-CASTELLE D.	Mathématiques
BRETAGNOLLE J. P.	Mathématiques
RIEHL J. J.	Chimie
DELLACHERIE Cl.	Mathématiques

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES

MM.

AVANISSIAN V.	Mathématiques
APSIMON J.	Chimie
CAIROLI R.	Mathématiques
DADE E.	Mathématiques
GOLDWHITE H.	Chimie
LETTA G.	Mathématiques
RINEHART G.	Mathématiques
SZYMONA M.	Chimie biologique

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE

M.

SAINT-PE G.

Les recherches faisant l'objet de la présente thèse ont été effectuées à partir de 1963 à l'Institut de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg au sein du groupe de Virologie qui est devenu en 1966 le groupe de Recherches de l'INSERM sur la Pathogénie des Infections Virales.

Avant d'aborder l'exposé des résultats que je soumetts à mes juges, je tiens à rendre hommage à Monsieur le Professeur A. LWOFF. Les encouragements bienveillants qu'il m'a souvent prodigués ont été pour moi un stimulant efficace. Je me permets de me faire ici l'interprète de tous mes collègues pour le remercier de l'impulsion qu'il a su donner à notre groupe strasbourgeois.

Monsieur le Professeur R. MINCK m'a ouvert la carrière de chercheur en me permettant d'exercer de 1961 à 1965 les fonctions d'assistante de Sciences Fondamentales dans son Institut. Qu'il veuille bien accepter l'expression de mes plus vifs remerciements.

Mon président de thèse Monsieur le Professeur L. HIRTH, dont le brillant enseignement m'a fait découvrir la microbiologie a bien voulu se charger de me parrainer au Centre National de la Recherche Scientifique. Je suis heureuse de pouvoir lui exprimer ici mes sentiments de respectueuse et profonde gratitude.

C'est un honneur pour moi de compter parmi mes juges Monsieur le Professeur C. JUNGWIRTH dont les travaux sur les virus du groupe Pox font autorité. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de ma très vive reconnaissance.

Les relations entre la microbiologie et la biochimie m'ont été enseignées par le Professeur J.P. EBEL. Je le remercie très sincèrement pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail.

Ces recherches ont été dirigées par Monsieur le Professeur A. KIRN. Il m'en voudrait de ne pas associer aux sincères remerciements que je lui adresse toute l'équipe du laboratoire qui m'a entourée et aidée.

Je remercie tout particulièrement Jean GUIR dont l'imagination n'a jamais été inhibée par les températures supra-optimales, Annick BINGEN qui a manié avec adresse la caméra de son microscope électronique, Gérard BURKARD dont la collaboration souriante a été tout aussi efficace que sympathique.

C'est grâce au dévouement et au travail acharné de Madeleine KLEIN et de Françoise KOEHREN que les différentes techniques utilisées ont pu être mises au point. Qu'elles en soient très sincèrement remerciées. Je remercie également Danielle JAEGER pour sa collaboration particulièrement dynamique à la présentation de ce travail.

x

x x

..... " Je signale, à ce sujet, les tentatives inutiles, faites à plusieurs reprises par moi et par M. Colin, professeur à l'Ecole vétérinaire d'Alfort, pour inoculer le charbon à une poule avec des gouttes de sang charbonneux. L'expérience a établi que la bactériémie ne peut se développer dans certains milieux, ou à la température de 44°. Les oiseaux, on le sait, ont un sang dont la température est plus élevée que celle du sang des autres animaux ; ne se pourrait-il pas que ce fût là la raison qui fait qu'ils sont réfractaires à la maladie charbonneuse ? Les premiers faits, constatés par moi, s'accordent avec l'idée préconçue ; ainsi les lapins chauffés, et auxquels on avait inoculé le charbon, n'ont pas péri et on verra que les poules refroidies se l'inoculent. Si cette découverte se vérifie dans toutes ses conséquences, on pourrait espérer guérir un homme atteint du charbon, en le plongeant dans un bain assez chaud, pour le maintenir à une température de 41 à 42° environ. "

Louis PASTEUR

Bulletin de la Société centrale d'agriculture
de France, séance du 6 mars 1878.
XXXVIII, pages 119 - 124.

I N T R O D U C T I O N

De nombreux facteurs sont capables d'inhiber le développement intracellulaire des virus. Parmi ces facteurs la température et son rôle dans la multiplication des virions a fait l'objet de travaux approfondis menés par A. LWOFF (1 - 2) et par A. et M. LWOFF (3 - 4 - 5) depuis 1959.

Dès 1939 BURNET et LUSH (6) ont constaté que la température de 36°C est la plus favorable à l'apparition de lésions provoquées par le virus de l'ectromélie sur la membrane chorioallantoïdienne de l'oeuf de poule. A 39°C le développement viral est inhibé, ce qui se traduit par la survie des embryons et à 39,5°C plus aucune lésion n'apparaît.

En 1941, ENDERS et PEARSON (7) ont fait une observation intéressante : le virus de l'influenza se multiplie dans l'oeuf de poule embryonné, mais non dans le poussin éclos. Etant donné que la température du poussin est de 41°C alors que l'oeuf embryonné est incubé à 38°C, les auteurs pensent que c'est cette différence de température qui est responsable de l'inhibition du développement du virus chez le poussin.

THOMPSON et COATES (8) ont montré que sur des cultures de cellules d'embryon de poulet le virus vaccinal est inhibé à une température supérieure à 45°C, le virus du myxome à 42,2°C et le virus herpétique à 40°C.

BEDSON et DUMBELL (9) qui ont étudié le développement de différents virus du groupe Pox sur la membrane chorioallantoïdienne de l'oeuf de poule ont constaté que la température d'inhibition du développement varie selon les virus. Ainsi ces températures sont de 40,5°C pour le virus de la vaccine, de 37,5°C pour celui de l'alastrim, de 39°C pour le virus de l'ectromélie, de 38,5°C pour le virus de la variole, de 40°C pour le virus du cowpox, de 39°C pour celui du monkeypox et de 41,5°C pour le virus du rabbitpox.

Dans leur remarquable étude sur la sensibilité du développement du poliovirus à la température, A. et M. LWOFF (3 - 4 - 5) ont énoncé une série de conclusions fondamentales qui peuvent se résumer ainsi :

- le développement viral ne s'accomplit que dans certaines limites étroites de températures,
- la courbe de thermosensibilité est caractéristique d'une souche

- donnée et varie avec les mutations,
- la sélection de mutants "froids" ainsi que l'étude de leurs courbes de sensibilité à la température démontrent que la diminution de la psychrosensibilité s'accompagne d'une diminution de la thermorésistance,
 - l'étude de mutants "chauds" aboutit à des résultats opposés,
 - l'acquisition du caractère "froid" est accompagnée d'une perte de virulence, alors que celle du caractère "chaud" conduit à l'augmentation de la virulence.

Nous nous sommes posé la question de savoir si ces conclusions qui avaient été tirées de l'étude d'un virus à RNA peuvent également s'appliquer à un virus à DNA et si on pouvait confirmer que les observations de LWOFF avaient bien le caractère de généralité que cet auteur leur supposait.

Parmi les virus à DNA nous avons choisi le virus de la vaccine pour différentes raisons. Ce virus se développe dans la plupart des cellules de mammifères et d'oiseaux en donnant des rendements élevés. Son développement intracytoplasmique offre de grandes facilités techniques pour des études biochimique et autoradiographique et les différentes étapes de sa replication sont relativement bien connues. Enfin il possède un pouvoir pathogène important pour un grand nombre d'animaux de laboratoire.

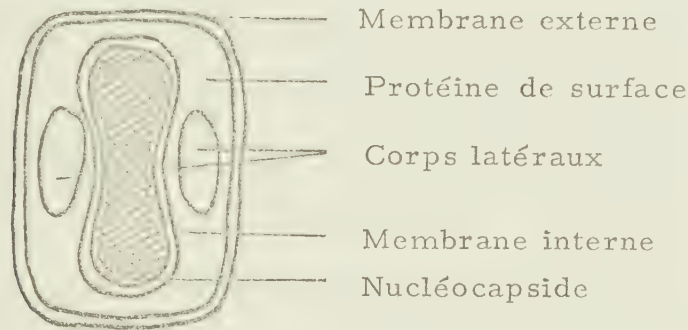
Avant d'entreprendre l'exposé des résultats de nos recherches, il nous semble utile de rappeler quelques notions fondamentales concernant les virus du groupe Pox.

Les Pox virus sont de gros virus dont la taille varie de 250 à 350 mμ. Grâce aux études entreprises au microscope électronique on connaît leur structure (MÜLLER et PETERS - 10 ; DALES - 11 ; WESTWOOD et collaborateurs - 12 ; EASTERBROOK - 13).

De l'extérieur vers l'intérieur de la particule virale on peut distinguer :

- une enveloppe externe qui est composée d'une membrane et d'une couche de sous-unités protéiques arrangées d'une manière plus ou moins régulière et comprenant deux corps latéraux,
- la nucléocapside ou nucléoïde qui est elle-même entourée d'une membrane interne et qui présente le plus souvent une forme biconcave. Ce nucléoïde contient le génome.

Schématiquement la structure d'un virion du groupe des Pox virus peut être représentée de la manière suivante.



Des analyses chimiques effectuées sur le virus vaccinal (HOAGLAND et collaborateurs - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 ; SMADEL et collaborateurs - 19 ; JOKLIK - 20 ; ZWARTOUW - 21) qui a été obtenu relativement tôt sous forme purifiée, ont montré qu'une particule virale est composée de 2,1 à 7,8 pour 100 de DNA, de 2 pour 100 de lipides, de 2 pour 100 de phospholipides et d'environ 90 pour 100 de protéines. Le poids d'une particule virale de virus vaccinal est d'environ de $5,5 \cdot 10^{-15}$ g (SMADEL et collaborateurs - 22 ; JOKLIK - 20) et la quantité de DNA dans un virion est de $2,75 \cdot 10^{-16}$ g (ALLISON et BURKE - 23).

Le DNA des virus du groupe Pox est difficile à obtenir à l'état pur car il est intimement lié à des protéines. Par des traitements soit au dodecylsulfate de sodium (HYDE et collaborateurs - 24), soit au désoxycholate de sodium et à la pronase (PFAU et MAC CREA - 25) on a pu obtenir néanmoins une séparation complète du DNA et des protéines. Le DNA viral apparaît alors comme une molécule unique, en double hélice ayant une longueur comprise entre 83 et 100 μ et contenant 36 pour 100 de guanine et de cytosine ; son poids moléculaire est de 160 millions de daltons (JOKLIK - 26).

Les protéines constitutives des Pox virus ont été étudiées par plusieurs méthodes qui reposent sur deux principes : une solubilisation des protéines du virus purifié, et une étude de protéines solubles apparaissant dans des cultures de cellules infectées.

- une étude par électrophorèse sur gel de polyacrylamide de préparations de cowpox traitées par le dodecylsulfate de sodium, l'urée et le mercapto-éthanol a permis de mettre en évidence quinze bandes (27). Toutefois ces réactifs non seulement détruisent les structures secondaire et tertiaire des protéines, mais donnent naissance à un mélange complexe de polypeptides qu'il est difficile de séparer.

HOLOWCZAK et JOKLIK (28 - 29) en utilisant un détergent non ionique, le NP 40, ont déterminé la localisation de plusieurs groupes de protéines du virus vaccinal ainsi que leur temps de synthèse.

Les plus importants sont les suivants :

- le groupe VSP-6 situé à la surface du virion et composé de protéines précoces,
 - les groupes VSP-1 et VSP-2 situés dans la nucléocapside et formés par des protéines précoces,
 - le groupe VSP-4, situé également dans la nucléocapside et composé de protéines tardives.
- sur des préparations purifiées de virus vaccinal obtenu par des traitements aux alcalis (ZWARTOUW et collaborateurs - 30) ou par désintégration mécanique (MARQUARDT et collaborateurs - 31) on a pu détecter au moyen de l'immunodiffusion huit constituants réagissant avec un antisérum hyperimmun.
 - par digestion alcaline du virus vaccinal on a isolé l'antigène NP qui est en fait un mélange d'antigènes (ZWARTOUW et collaborateurs - 30) ; cet antigène est commun à tous les virus du groupe Pox et est associé à la nucléocapside (WOODROOFE et FENNER - 32).
 - d'autres protéines apparaissent sous forme d'antigènes solubles dans des cellules infectées, et par la technique de l'immunodiffusion on a pu en détecter une vingtaine dans les cellules HeLa infectées avec le rabbitpox (APPLEYARD et WESTWOOD - 33 ; WESTWOOD et collaborateurs - 34).

Deux constituants du mélange des antigènes solubles ont été analysés. L'un, qui a pu être purifié, est une protéine avec un poids moléculaire compris entre 100.000 et 200.000 ; il réagit avec les anticorps neutralisants (APPLEYARD et collaborateurs - 35) et produit des anticorps neutralisants quand il est injecté au lapin (APPLEYARD et WESTWOOD - 36). L'autre antigène soluble qui a été obtenu à l'état pur est l'antigène LS (SHEDLOVSKY et SMADEL - 37) qui est situé à la surface du virion.

- par des centrifugations en gradient de densité on a mis en évidence l'hémagglutinine qui est une formation lipoprotéique distincte de la particule virale (FENNER - 38).

Les Pox virus contiennent également des phospholipides (2,2 pour 100), des graisses neutres (2 pour 100) et du cholestérol (1,3 pour 100) (HOAGLAND et collaborateurs - 14 ; ZWARTOUW - 21). Ces constituants joueraient un rôle dans le pouvoir infectieux ; en effet des traitements qui détruisent les phospholipides et les graisses neutres affectent le pouvoir infectieux des virions.

Le développement des virions dans le cytoplasme des cellules infectées se fait en plusieurs étapes. Les particules virales s'adsorbent sur la membrane cellulaire puis pénètrent par phagocytose dans la cellule où elles sont décapsidées avec libération du DNA viral. La replication du DNA et la synthèse des protéines virales s'effectuent pendant la phase d'éclipse dans des centres de synthèse appelés viroplasmes ou factories. Après la morphogénèse les virions néoformés sont libérés dans le milieu extérieur.

Les évènements qui permettent la formation de particules virales et qui ont lieu principalement pendant la phase d'éclipse sont les suivants :

- transcription de certaines régions spécifiques du génome parental,
- attachement du m RNA viral aux polyribosomes,
- synthèse d'enzymes spécifiques virales et de protéines précoces,
- replication du DNA viral,
- transcription du DNA parental et du DNA néoformé,
- traduction de ces m RNA en protéines de structure et en protéines spécifiques dont quelques-unes ont des fonctions régulatrices,
- maturation, c'est-à-dire assemblage des différents constituants pour former le virion.

Dans la première partie de ce travail nous étudierons la thermosensibilité du développement de deux souches du virus de la vaccine. Elle comportera les chapitres suivants :

- 1°) Etude du développement du virus vaccinal en fonction de la température.
- 2°) Obtention de mutants thermosensibles et thermorésistants.

3°) Caractères des mutants thermosensibles et thermorésistants.

4°) Détermination de la phase du cycle viral sensible à la température.

Dans la seconde partie, nous étudierons plus particulièrement les évènements qui se déroulent pendant la phase primaire, à savoir la replication du DNA viral et nous essayerons de définir les mécanismes responsables de l'inhibition du développement viral à température élevée. Cette partie sera composée des chapitres suivants :

1°) Etude de l'inhibition de la replication du DNA du mutant "froid" à température supra-optimale.

2°) Etude de la thermosensibilité des protéines précoces.

3°) Etude de la synthèse et du fonctionnement des enzymes impliquées dans la replication du DNA du virus vaccinal.

x
x x

P R E M I E R E P A R T I E

THERMOSENSIBILITE DU DEVELOPPEMENT DE DIFFERENTES

SOUCHES DU VIRUS DE LA VACCINE

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E S

I. SOUCHES CELLULAIRES.

A) Souche KB

La souche cellulaire KB (39) utilisée dans ce travail nous a été obligeamment remise par le Docteur MAURIN de l'Institut Pasteur de Paris.

Elle est entretenue dans notre laboratoire par repiquages successifs. Les cellules d'origine sont conservées à - 196°C dans des ampoules scellées plongées dans l'azote liquide à raison de 2×10^6 cellules/ml de milieu de conservation.

B) Souche L (TK-)

Les cellules L déficientes en thymidine kinase TK⁻ (40) proviennent du laboratoire du Professeur Paul TOURNIER (Centre de Recherches Scientifiques sur le Cancer - Villejuif).

II. MILIEUX ET SOLUTIONS TAMPONS.

A) Milieu LaYe

Pour l'entretien de la souche KB nous utilisons un milieu à base d'hydrolysate de lactalbumine et d'extrait de levure (3) dénommé LaYe (Lactalbumine - Yeast Extract). Ce milieu convient parfaitement bien pour le développement des cellules KB.

1) Composition du milieu LaYe

Hydrolysate de Lactalbumine °	5 g
Extrait de levure °°	1 g

° Lactalbumine hydrolysate (enzymatic)

NUTRITIONAL BIOCHEMICALS CORPORATION - CLEVELAND - Ohio (US)

°° Yeast-Extract - DIFCO Laboratories - DETROIT 1 - Michigan (USA)
(Représentés par OSI - 141, rue de Javel - 75 PARIS XVème)

Rouge de phénol °	0,015 g
Solution de sels minéraux	1 000 ml

2) Préparation du milieu LaYe (2 litres)

On prépare une solution mère de lactalbumine et d'extrait de levure composée ainsi :

Lactalbumine	100	g
Extrait de levure	20	g
Eau bidistillée	2 000	ml

La préparation est stérilisée par filtration sur filtre Seitz et peut être conservée pendant plus de 6 mois à + 4°C.

On prépare les solutions suivantes :

Solution A

Lact-Yeast	200	ml
Rouge de phénol 10 pour 1 000	3	ml
NaOH N	60 - 70	gouttes
Eau bidistillée	500	ml

Solution B

NaCl	14,35	g
KCl	0,8	g
SO ₄ Mg, 7 H ₂ O	0,4	g
PO ₄ H ₂ Na	0,25	g
Glucose	9	g
Eau bidistillée	500	ml

Solution C

Cl ₂ Ca	0,4	g
Eau bidistillée	100	ml

° R.A.L. - KUHLMANN.

Laboratoire de la ROBERTSAU - 181, route de la Wantzenau -
67 STRASBOURG-ROBERTSAU.

Solution D

CO ₃ HNa	4,4	g
Eau bidistillée	200	ml

On verse les solutions A et C dans B ; on ajoute ensuite le mélange d'antibiotiques puis la solution D ; on complète à 2 litres avec de l'eau bidistillée sur Quartz (BD 50 - Westdeutsche Quarzschmelze) et après avoir mélangé soigneusement on introduit un courant de CO₂ pour amener le pH à 7.

La stérilisation est effectuée sous pression soit sur des membranes Millipore ° (G S W P) pour les grandes quantités soit sur disques filtrants Seitz °° (E K S 2) pour les petites quantités de milieu. On utilise un mélange Air 95 pour 100 - CO₂ 5 pour 100 afin d'éviter l'alcalinisation du milieu durant la filtration.

Le milieu ainsi préparé est conservé à + 4°C dans des bouteilles de 500 ou 1 000 ml. Avant utilisation, on l'enrichit avec 5 pour 100 de sérum de veau stérile.

Ce milieu est utilisé pour la mise en culture des cellules lors du repiquage.

B) Milieu LaYe O

La composition du milieu LaYe 0 est identique à celle du milieu LaYe, exception faite de la concentration en bicarbonates qui n'est que de 1 pour 1 000. Il est utilisé pour remplacer le milieu LaYe lors des changements de milieu.

C) Milieu de Eagle

Lorsqu'on utilise des inhibiteurs du développement viral ainsi que des précurseurs marqués (thymidine, uridine, etc...) et qu'il

° MILLIPORE - 39, rue Chauvelot - 75 MALAKOFF

°° COFRAM SEITZ - 5, rue Abel - 75 PARIS XIIème

convient d'employer un milieu de culture chimiquement défini, on a recours au milieu de base de Eagle (41).

Sa composition est la suivante :

Solution saline équilibrée de Earle (42)

	g/litre
NaCl	6,800
KCl	0,400
NaH ₂ PO ₄ , H ₂ O	0,125
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,200
Glucose	1,000
CaCl ₂ (anhydre)	0,200
Rouge de phénol	0,010
NaHCO ₃	2,200

Amino-Acides

	g/litre
L.-arginine HCl	0,021
L.-cystine	0,012
L.-tyrosine	0,018
L.-histidine	0,008
L.-isoleucine	0,026
L.-leucine	0,026
L.-lysine	0,026
L.-méthionine	0,0075
L.-phénylalanine	0,0165
L.-thréonine	0,024
L.-thryptophane	0,004
L.-valine	0,0235
L.-glutamine	0,292

Vitamines

	g/litre
Biotine	0,001
Acide folique	0,001
Choline chlorure	0,001
Nicotinamide	0,001
D-pantothénate, Ca	0,001
Pyridoxal, HCl	0,001
Thiamine, HCl	0,001

Riboflavine	g/litre
I-inositol	0,0001
	0,0018

Ce milieu est fourni sous forme de sachets de poudre pour 5 litres (MBE 0011) par les laboratoires EUROBIO ° . Il suffit de dissoudre le milieu sec dans l'eau bidistillée, d'ajouter du bicarbonate de soude (0,4 g/l.) , les antibiotiques et de le stériliser par filtration.

Pour l'entretien de la souche TK⁻ on utilise le milieu de Eagle contenant du tryptose °°.

Une solution de 29,5 g de tryptose par litre est stérilisée à l'autoclave à + 120°C pendant 15 minutes. Pour 2 litres de milieu de Eagle on ajoute 200 ml de la solution de tryptose.

D) Milieu de conservation.

Ce milieu qui est utilisé pour la congélation des cellules à - 196°C est constitué par du milieu de Eagle additionné de 20 pour 100 de sérum de veau et de 10 pour 100 de diméthylsulfoxyde. 2 x 10⁶ cellules/ml de milieu de conservation dans des ampoules scellées, sont placées dans un congélateur à - 25°C durant 18 heures. Les ampoules fixées sur un portoir spécial sont ensuite plongées rapidement dans le conservateur à azote liquide °°°.

Pour la décongélation, on retire un portoir qu'on introduit immédiatement dans un bain-marie à 37°C en agitant continuellement. Les cellules décongelées sont mises en culture dans du milieu LaYe.

° Laboratoires EUROBIO - 20, boulevard St. Germain - 75 PARIS Vème

°° Tryptose phosphate broth -
DIFCO Laboratories - DETROIT 1 - Michigan (USA)
Représentés en France par - OSI.

°°° COMPAGNIE FRANCAISE DE PRODUITS OXYGENES -
Direction Régionale EST - 109, Boulevard d'Haussonville - 54 NANCY

E) Tampon sans ions Ca^{++} ni Mg^{++} .

Ce tampon sert à laver les cultures cellulaires avant les repiquages.

Sa composition est la suivante :

NaCl	16 g
ClK	0,4 g
PO_4HNa_2	2,3 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,4 g
Eau bidistillée	1 500 ml

On stérilise à l'autoclave à + 115°C pendant 1 heure, puis on ajoute les antibiotiques et on complète à 2 litres avec de l'eau bidistillée stérile.

F) Tampon phosphate - PBS.

La composition de ce tampon est la même que celle du précédent, mais il renferme en plus des ions Ca^{++} et Mg^{++} . Il est utilisé pour laver les cellules avant l'ensemencement du virus.

On le prépare suivant le protocole ci-dessous :

Solution A

NaCl	16 g
ClK	0,4 g
PO_4HNa_2	2,3 g
$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,4 g
Eau bidistillée	1 500 ml

Solution B

Cl_2Ca	0,2 g
Eau bidistillée	200 ml

Solution C

$\text{Cl}_2\text{Mg}, 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,2 g
Eau bidistillée	200 ml

On réunit les solutions B et C à la solution A, on mélange soigneusement en agitant constamment, on ajoute les antibiotiques, on complète à 2 litres et on stérilise par filtration sur filtre Seitz ou Millipore.

G) Solution de versénate de sodium 0,2 pour 1 000.

Cette solution sert à décoller les cellules de la paroi des flacons lors des repiquages. Sa composition est la même que celle du tampon sans ions Ca^{++} ni Mg^{++} auquel on ajoute 0,4 g de versénate ° de sodium pour 2 litres de solution.

Sa préparation s'effectue selon le même mode opératoire.

H) Solution de trypsine 2 pour 1 000.

On dissout 2 g de trypsine °° dans 1 litre de PBS après adjonction d'antibiotiques. La solution est stérilisée sur filtre Seitz ou Millipore.

I) Solution Earle - gélatine.

Pour diluer les suspensions virales destinées au titrage des virions, nous utilisons la solution Earle-gélatine.

Composition du milieu Earle-gélatine

NaCl	13,6	g
KCl	0,8	g
$\text{SO}_4\text{Mg}, 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,2	g
NaH_2PO_4	0,25	g
$\text{CO}_3 \text{HNa}$	4,4	g
Glucose	2	g
CaCl_2	2	g
Gélatine	2	g
Rouge de phénol 10 pour 1000	40	ml
Eau bidistillée	2 000	ml

° Versénate de sodium = éthylenediamino tetra-acétate disodique ou EDTA (MERCK - DARMSTADT - Allemagne)

° ° Bacto trypsine - DIFCO laboratories - DETROIT 1 - Michigan (USA)
Représentés en France par OSI.

Le chlorure de calcium et la gélatine sont dissous à part, on ajoute ces deux solutions ainsi que les antibiotiques à la solution saline, et le mélange est stérilisé par filtration sur filtre Seitz.

J) Rouge neutre à 4 pour 1 000 °.

La solution de rouge neutre est utilisée pour la coloration des cellules des tubes de titrage en vue de dénombrer plus facilement les plages. Dans un mortier on place 4 g de rouge neutre ; on verse petit à petit de l'alcool à 75 pour 100 tout en broyant ; on laisse reposer et on décante. On recommence l'opération jusqu'à ce que la poudre soit en solution dans un litre d'alcool. On filtre pour avoir une préparation limpide.

K) Rouge de phénol à 10 pour 1 000 °°.

Pour faciliter la surveillance du pH des milieux qui doit être situé entre 7 et 7,4, nous utilisons comme indicateur le rouge de phénol. Sur 10 g de rouge de phénol on verse petit à petit de la soude N/20 jusqu'à dissolution complète (environ 700 à 800 ml de soude) ; on complète à 1 litre avec de l'eau bidistillée et la solution est conservée à + 4°C.

L) Antibiotiques.

Les solutions d'antibiotiques sont préparées extemporanément dans de l'eau bidistillée.

Pour 2 litres de milieu, on ajoute :

1 g de streptomycine °°°
1.000.000 U de pénicilline °°°
1.000.000 U de colimycine °°°°

° RAL - KUHLMANN

°° RAL - KUHLMANN

°°° SPECIA - Rue Jean Goujon - 75 PARIS VIIIème

°°°° Laboratoire ROGER BELLON - 159 avenue du Roule - 92 NEUILLY

III. MATERIEL ET TECHNIQUES POUR LA CULTURE DES CELLULES KB.

A) Verrerie.

Nous utilisons différents types de flacons de culture dont la provenance est indiquée ci-dessous.

- flacons plats en verre ordinaire de 10 x 6 x 3 cm offrant une surface de culture de 60 cm² environ °.
- boîtes de Roux de 21 x 12 x 15 cm offrant une surface de culture de 250 cm² °°.
- flacons plasma de 1 litre (longueur 20 cm, diamètre 9 cm, surface de culture 560 cm²°.
- flacons plasma de 2 litres (longueur 25 cm, diamètre 11 cm, surface de culture 860 cm² °.
- tubes de Leighton pourvus d'une surface de culture de 6 cm² °°°.

Les flacons plats, les boîtes de Roux qui servent à l'entretien des lignées cellulaires et les tubes de Leighton utilisés pour le titrage des virions sont incubés à plat dans la chambre chaude. Les flacons plasma destinés à la production en masse des cellules sont mis à incuber à 37°C dans un tambour de 1 m 35 de diamètre tournant à une vitesse de 7 tours/heure.

B) Entretien et repiquage des cellules.

On se contentera ici d'indiquer les grandes lignes de cette technique désormais classique en virologie animale.

° Verrerie PERRIN - 67 SCHILTIGHEIM

° ° BERTHON & REMEUR - 77 BRIE-COMTE-ROBERT

° ° ° BELLCO GLASS, INC. - VINELAND - New-Jersey (USA)

Lorsque la couche cellulaire couvre tout le flacon, le milieu est retiré et les cellules sont lavées avec le tampon sans ions Ca^{++} ni Mg^{++} . On fait ensuite agir le versénate de sodium durant quelques minutes jusqu'au décollement complet du tapis cellulaire. Si on utilise la trypsine pour détacher les cellules du verre, il convient de les laver au préalable avec du PBS. Après une centrifugation douce à 200 tours/minute pendant 5 minutes, le culot cellulaire est lavé avec du tampon et mis en suspension dans un petit volume de milieu LaYe. On dénombre ensuite les cellules à l'aide d'un hématimètre de BURKER et on les remet en suspension à raison de 2 à 4×10^5 cellules/ml de milieu LaYe enrichi avec 5 pour 100 de sérum de veau. On répartit ensuite un certain volume de cette suspension dans le type de flacons choisi et on introduit pendant quelques secondes un courant d'air CO_2 (5 pour 100 de CO_2), puis on incube à la chambre chaude à 37°C . Le 3ème jour on effectue un changement de milieu en remplaçant le milieu LaYe par une même quantité de milieu LaYe 0. Au 6ème jour les cellules sont assez riches pour qu'on puisse effectuer un nouveau repiquage.

Les flacons plats sontensemencés avec 12 ml d'une suspension contenant 4×10^5 cellules/ml. Les boîtes de Roux reçoivent 80 ml d'une suspension de $2,5 \times 10^5$ cellules/ml. Les flacons plasma de 1 litre sont repiqués avec 100 ml d'une suspension de 4×10^5 cellules/ml et les flacons plasma de 2 litres avec 200 ml d'une suspension contenant 3×10^5 cellules/ml.

IV. VIRUS - REPIQUAGE DES SOUCHES.

A) Souches d'origine.

1) Souche VaMe

Nous avons obtenu une souche lyophilisée de virus vaccinal (souche Lister) grâce à l'obligeance du Docteur TRIAU de l'Institut Mérieux de Lyon.

Cette souche qui a été repiquée 20 fois sur cellules KB à 37°C est dénommée VaMe $37^\circ/20$.

2) Souche WR.

La souche utilisée est la souche WR (mouse neurotropic) de l'American Type Culture Collection °. Elle a subi 21 passages sur cellules KB à 37°C et est dénommée WR 37°/21.

B) Conservation des souches.

Les suspensions virales sont conservées au congélateur à - 25°C. Des contrôles de dispersion effectués au microscope électronique montrent une absence totale d'agglutination des particules virales.

C) Repiquage des souches - Préparation des virus stock.

Nous utilisons des cellules KB âgées de 48 heures et cultivées en flacons plats de 60 cm² de surface.

Après avoir lavé la couche cellulaire au PBS, on ensemence 0,5 à 1 ml de la suspension virale à repiquer et on laisse en contact pendant 1 heure à la température du laboratoire.

Les cellules sont alors lavées deux fois avec du PBS, puis recouvertes avec 10 ml de milieu LaYe enrichi avec 5 pour 100 de sérum de veau. On incube les flacons soit à l'étuve, soit dans des bains-marie à des températures déterminées ; dans ce dernier cas, on a pris soin de rendre les flacons étanches avec des capuchons en caoutchouc. Chaque jour on observe l'évolution de la nécrose et quand un décollement presque complet des cellules s'est produit, les flacons sont congelés à - 35°C.

Afin de récupérer les virions intra et extra-cellulaires, on procède deux fois à une alternance de congélation et de décongélation de 2 minutes à - 70 et 35°C. La suspension est alors centrifugée à 1 000 tours/min^{te} pendant 5 minutes et le surnageant est recueilli.

Pour préparer des stocks importants de virus, des flacons plasma de 1 litre sont ensemencés avec 10 ml de suspension virale. Après la période d'adsorption, on ajoute 100 ml de milieu de culture et on place les flacons sur le tambour rotatif. Les cellules infectées recueillies sont traitées aux ultra-sons à une fréquence de 20 Kc/seconde et à une amplitude de 6 (MSE ultrasonic disintegrator °°) ce qui permet de récupérer les virions intra-cellulaires.

° A. T. C. C. - 12301 Parklawn Drive - ROCKVILLE - Maryland (USA)

°° MSE - représenté en France par OSI.

V. TITRAGE DES PARTICULES INFECTIEUSES (43-44)

Nous utilisons des cellules KB de 24 heures cultivées en tubes de Leighton. Après un lavage au PBS, les tubes sont ensemencés avec les dilutions de virus sous un volume de 0,1 ml. Les dilutions sont effectuées soit dans le milieu Earle-gélatine soit dans le milieu de LaYe. Après 1 heure d'adsorption à la température de 20°C, on ajoute 2 ml de milieu LaYe enrichi avec 5 pour 100 de sérum de veau, et on incube à 37°C ou à 35°C.

Après 36 heures d'incubation, on colore les cellules avec une solution de rouge neutre à 4 pour 1 000 qu'on laisse agir pendant 30 minutes à température ordinaire. Le dénombrement des plages est effectué sous une loupe avec un grossissement de 6 fois. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant des plages par millilitre (UFP/ml).

VI. DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE EN CYCLE UNIQUE.

Des cellules âgées de 48 heures cultivées en boîtes de Roux sont lavées au tampon sans Ca^{++} ni Mg^{++} , puis traitées par la solution de versénate de sodium de façon à obtenir un décollement complet. Après centrifugation, le culot cellulaire est lavé deux fois au PBS et les cellules sont dénombrées. Un culot de 7×10^6 cellules est mis en présence d'un volume de 0,1 à 0,5 ml d'une suspension virale diluée dans du LaYe de manière à obtenir une multiplicité de 2. On mélange soigneusement, puis on place les tubes au bain-marie à 37 °C où on les maintient en agitation durant 10 minutes. On ajoute alors 10 ml de milieu LaYe, on pipette énergiquement pour laver les cellules et on centrifuge pour éliminer les virions non adsorbés. Dans ces conditions le taux d'adsorption varie de 70 à 95 pour 100. Le culot cellulaire est réparti dans le milieu LaYe contenant 5 pour 100 de sérum de veau à raison de 2×10^5 cellules/ml. On remplit des fioles côniques siliconées de 100 ml à bouchon rodé avec 8 ml de cette suspension, on introduit le mélange gazeux air- CO_2 et on place les fioles dans des bains-marie agités.

A intervalles réguliers on effectue des prélèvements de 0,1 ml qui sont dilués immédiatement dans 0,9 ml de la solution Earle-gélatine et conservés à - 35°C jusqu'au moment du titrage. Lors de chaque prélèvement, le mélange air-CO₂ est renouvelé. Avant d'effectuer les dilutions des suspensions virales pour le titrage, les prélèvements sont congelés dans un mélange d'alcool et de neige carbonique et décongelés à 37°C à deux reprises.

Le système d'agitation que nous utilisons est constitué par des plateaux en plastique, montés sur ressorts dans quatre bains-marie indépendants, et dont le mouvement circulaire est obtenu par des excentriques de 3 cm de rayon tournant à 83 tours/minute.

Le chauffage des bains-marie est assuré par des unités Tecam Tempunit dont la précision est de plus ou moins 0,05°C. Ces appareils ne nous ayant pas donné satisfaction, nous les avons remplacés par la suite par des thermostats Thermomix (BRAUN - MELSUNGEN °).

VII. INOCULATION AUX ANIMAUX.

A) Souris.

Nous utilisons des souris "inbred" de 15 à 20 g provenant de la souche I C de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer de Villejuif. Les souris sont inoculées par voie intracérébrale avec 0,05 ml d'une dilution de suspension virale dans du LaYe enrichi avec 5 pour 100 de sérum de veau.

La détermination des doses létales 50 a été faite en inoculant un lot de 10 souris pour chaque dilution de virus. On tient compte de la mortalité qui survient entre le 5ème et le 12ème jour qui suit l'inoculation. Pour le calcul de la DL₅₀ nous avons appliqué la méthode de REED et MUENCH (45).

B) Lapins.

Nous utilisons des lapins albinos "New-Zeeland" de 1 500 à 2 000 g.

1) Pouvoir dermatrope.

Les lapins, qui ont été rasés sur les flancs et l'abdomen, sont inoculés à gauche avec différentes dilutions de virus "froid", sur la ligne médiane avec des dilutions de virus sauvage et à droite avec des dilutions de virus "chaud". Les injections sont faites par voie intradermique sous un volume de 0,1 ml.

La lecture des résultats est effectuée du 4ème au 6ème jour après l'inoculation en déterminant avec un compas le diamètre de la réaction inflammatoire.

Pour le calcul de la DIM_{50} (c'est-à-dire la dose de virus qui provoque chez 50 pour 100 des lapins l'apparition d'une lésion inflammatoire supérieure à 5 mm de diamètre) nous avons également appliqué la méthode de REED et MUENCH.

2) Pouvoir pneumotrope.

L'inoculation intratrachéale des virions est effectuée à travers les téguments après rasage et désinfection de la peau de la face antérieure du cou. 1 ml de la dilution de virus dans du milieu LaYe additionné de 5 pour 100 de sérum de veau est injecté à chaque lapin.

VIII. MICROSCOPE ELECTRONIQUE.

Les cellules KB, cultivées en tubes de Leighton, sont infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 à raison de 10 UFP/cellule.

L'adsorption a lieu soit à 36 soit à 41°C pendant 1 heure. Puis les cellules sont lavées deux fois avec du PBS et recouvertes de 2 ml de milieu de Eagle enrichi avec 5 pour 100 de sérum de veau.

A différents moments au cours du cycle, deux tubes sont retirés et fixés par la glutaraldéhyde à 2 pour 100 dans un tampon cacodylate à pH 7,2 selon la méthode de GORDON-MILLER (46), puis par l'acide osmique à 1 pour 100 d'après la technique utilisée par

MILLONIG (47). Le culot cellulaire enrobé dans l'agar noble est déshydraté puis inclus dans l'Epon 812 selon la méthode de LUFT (48).

Après polymérisation, les blocs débarrassés de la gélatine sont coupés à l'aide d'un ultra-microtome Porter Blum MT 1.

Les coupes déposées sur des grilles de cuivre recouvertes d'un film de formvar sont colorées pendant 15 minutes à l'acétate d'uranyle en solution alcoolique. Cette coloration est suivie d'une imprégnation au citrate de plomb selon la méthode de REYNOLDS (49).

L'examen des coupes est effectué avec un microscope électronique O. P. L.

x
x x

R E S U L T A T S

I. ETUDE DU DEVELOPPEMENT DES SOUCHES D'ORIGINE EN FONCTION DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION.

A) Cinétiques de développement des souches VaMe et WR à température optimale.

1) Souche VaMe

Pour vérifier la reproductibilité des techniques utilisées, il était important, dans un premier temps, d'étudier l'influence de l'inoculum sur la cinétique de développement du virus vaccinal à température optimale. C'est ainsi que nous avons comparé la cinétique de production des virions dans les cellules KB infectées avec 2 et 0,5 UFP/cellule de la souche VaMe 37°/20 et incubées à 37°C.

La figure 1 montre que pour un inoculum de 0,5 UFP/cellule, la courbe de formation des virions en fonction du temps présente un léger retard sur celle où 2 UFP/cellule ont été utilisées. Bien que le rendement final soit moins élevé, l'allure des courbes reste cependant semblable.

Pour la suite des expériences portant sur les cinétiques de développement des virions, nous avons adopté un inoculum de 2 UFP/cellule.

Les résultats que nous obtenons sont reproductibles et nous permettent de distinguer trois phases de développement.

- une phase de latence dont la durée dépend de l'importance de l'inoculum et où le titre en virions décroît,
- une phase de croissance exponentielle qui s'étend jusqu'à la huitième ou la douzième heure après l'infection selon l'inoculum,
- une phase où le titre en virions augmente plus lentement et qui dure jusqu'à la vingt-cinquième heure.

Il convient de noter que ces résultats concernent à la fois les virions intra et extra-cellulaires.

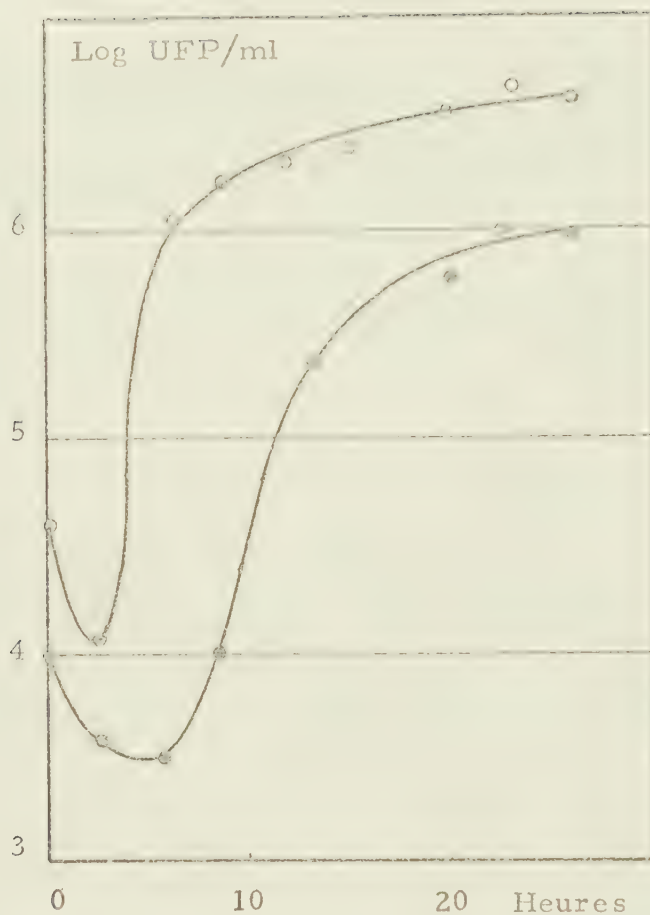


FIGURE 1. Cinétiques du développement de la souche d'origine VaMe 37°/20 en fonction de l'inoculum.

- inoculum deux particules infectieuses/cellule.
- inoculum 0,5 particule infectieuse/cellule.

2) Souche WR.

La courbe de développement à 37°C de la souche WR 37°/21 est représentée sur la figure 2.

La cinétique obtenue est comparable à celle de la souche VaMe bien que la vitesse de développement soit plus lente, ce qui se manifeste par un allongement des trois phases caractéristiques de la courbe de croissance.

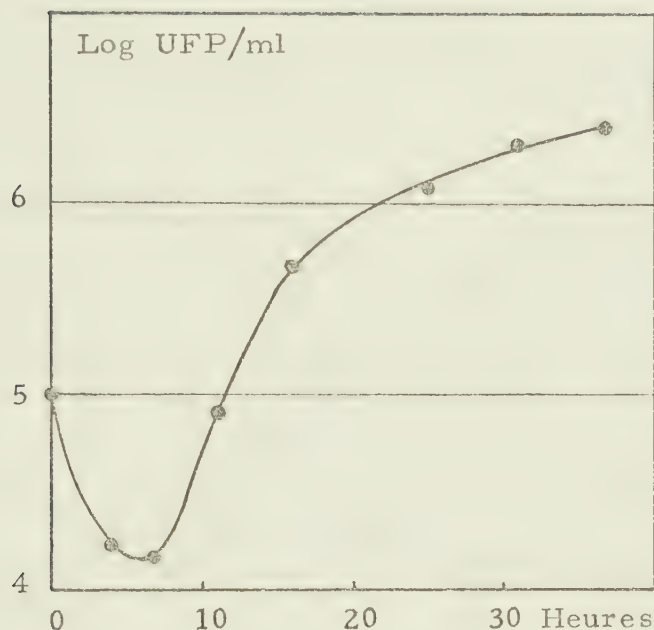


FIGURE 2. Cinétique de développement de la souche d'origine WR 37°/21 à 37°C.

B) Cinétiques de développement des souches VaMe et WR à températures supra-optimales.

1) Souche VaMe

Sur la figure 3 sont inscrites les courbes de croissance de la souche VaMe 37°/20 à 37, 39 et 40°C. Si l'on considère que le rendement à 37°C est égal à 100 pour 100, il n'est plus que de 38 pour 100 à 39°C et de 6 pour 100 à 40°C.

2) Souche WR

Les courbes de développement de la souche WR en fonction de la température sont reproduites dans la figure 4. On voit qu'à 39°C

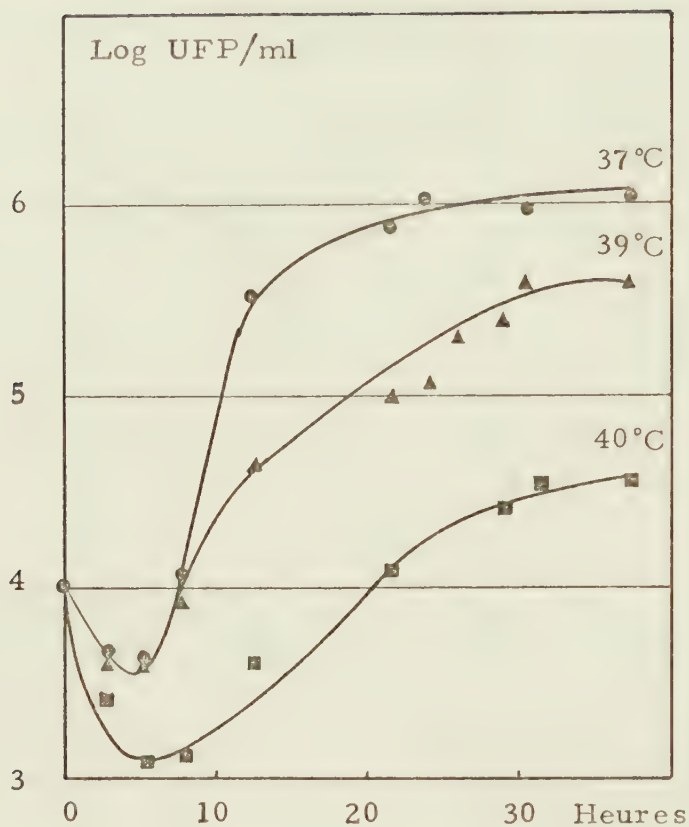


FIGURE 3. Cinétiques de développement de la souche d'origine VaMe 37°/20 en fonction de la température.

la production des virions est diminuée (rendement final 28 pour 100) et qu'à 40°C la multiplication des virions est presque totalement inhibée (rendement final 2,8 pour 100).

Pour les deux souches on remarque qu'à 39°C la croissance pendant la phase exponentielle est moins rapide qu'à 37°C ; ce phénomène est encore plus accusé à 40°C et s'accompagne en outre d'un allongement de la phase de latence.

On peut conclure de ces expériences que le développement des souches d'origine VaMe 37°/20 et WR 37°/21 est inhibé par les températures supra-optimales et que cette inhibition est d'autant plus importante que la température est plus élevée.

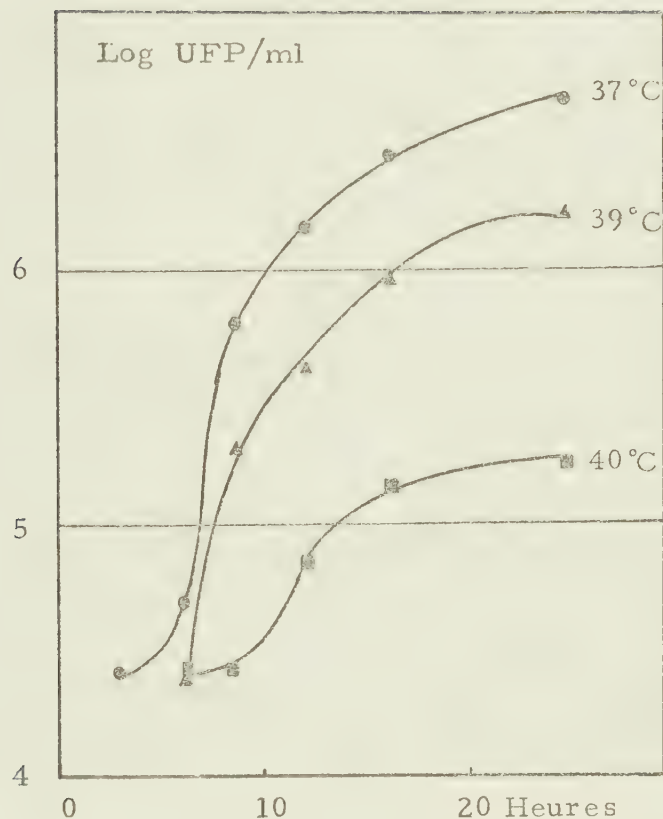


FIGURE 4. Cinétiques de développement de la souche d'origine WR 37°/21 en fonction de la température.

C) Cinétiques de développement des souches VaMe et WR à températures infra-optimales.

1) Souche VaMe.

Sur la figure 5 sont représentées les courbes de développement de la souche VaMe 37°/20 à 30 et à 37°C. A température infra-optimale, le rendement final est fortement diminué puisqu'il n'est plus que de 3 pour 100. On remarque également que la durée de la phase de latence est très nettement augmentée par rapport à celle observée à 37°C.

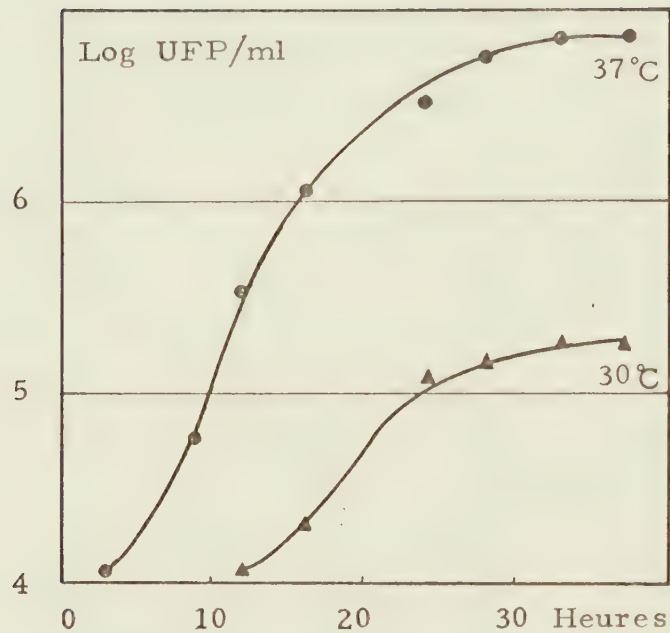


FIGURE 5. Cinétiques de développement de la souche d'origine VaMe 37°/20 à 37 et à 30°C.

2) Souche WR

A 34°C le rendement final de la souche WR 37°/21 est encore de 39 pour 100. Jusqu'à la dixième heure, les courbes de développement évoluent parallèlement à 37 et à 34°C ; on note alors un ralentissement marqué de la vitesse de production des virions à température infra-optimale comme le montre la figure 6.

Dans le tableau I sont inscrits les rendements finaux observés à différentes températures avec les souches VaMe et WR au cours de deux expériences différentes. On voit que les résultats sont reproductibles et que les températures infra-optimales ainsi que les températures supra-optimales inhibent le développement des deux souches de virus vaccinal utilisées dans ce travail.

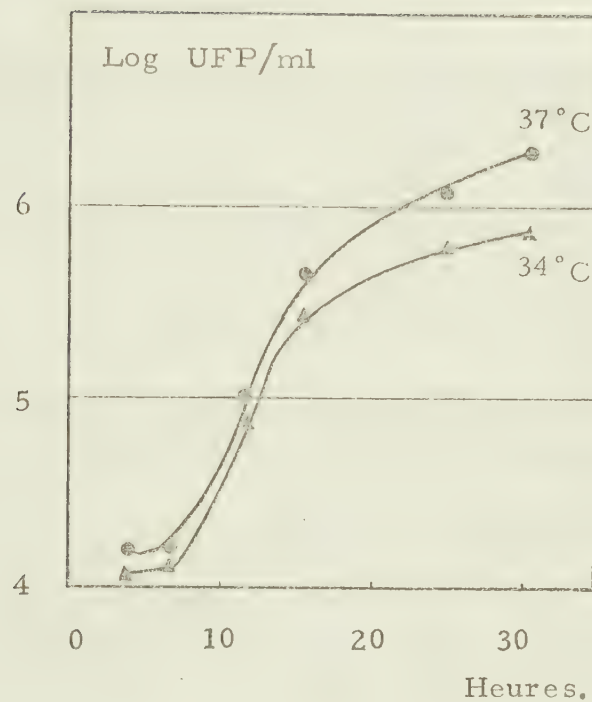


FIGURE 6. Cinétiques de développement de la souche d'origine WR 37°/21 à 37 et à 34°C.

	VaMe 37°/20			WR 37°/21			
Températures d'incubation	30°C	37°C	40°C	31°C	34°C	37°C	40°C
Exp. A	3 p 100	100 p 100	6 p 100	10 p 100	39 p 100	100 p 100	2,8 p 100
Exp. B	4 p 100	100 p 100	5,5 p 100	-	30 p 100	100 p 100	8,6 p 100

TABLEAU I. Rendement final en virions (UFP/ml) des souches d'origine VaMe et WR en fonction de la température d'incubation.

II. OBTENTION DE MUTANTS THERMOSENSIBLES ET THERMORESISTANTS.

A) Mutants thermosensibles ("froids").

Pour sélectionner des mutants "froids", nous avons procédé à des passages successifs à des températures régulièrement décroissantes.

Si l'on ensemence la souche d'origine VaMe 37°/20 sur des cellules KB et qu'on les incube à 25°C, il n'y a aucun développement viral notable. A 30°C, par contre, dès le premier passage on peut observer un effet cytopathogène spécifique. C'est ainsi que nous avons sélectionné des mutants "froids" en effectuant des passages à des températures s'échelonnant entre 30 et 25°C.

1) Souche VaMe.

Un mutant "froid" a été sélectionné à partir de la souche d'origine VaMe 37°/20 après quarante-quatre passages à températures infra-optimales répartis de la façon suivante :

- seize passages à 30°C
- trois passages à 29°C
- six passages à 28°C
- trois passages à 27°C
- seize passages à 25°C

Si, comme le proposent A. et M. LWOFF (3), on indique le nombre de passages à une température donnée par un chiffre, le mutant sera défini ainsi :

VaMe 30°/16, 29°/3, 28°/6, 27°/3, 25°/16.

Pour simplifier cette notation, nous nous contenterons d'indiquer la dernière température ainsi que le nombre de passages effectués à cette température. Le mutant "froid" de la souche VaMe est alors désigné VaMe 25°/16.

Au fur et à mesure des passages à une même température, le temps nécessaire pour obtenir une destruction complète de la couche cellulaire diminue. Ainsi lors des premiers passages à 30°C la nécrose est obtenue après cinq à six jours d'incubation, alors qu'après plusieurs repiquages, elle apparaît en quarante-huit heures. C'est alors qu'on abaisse la température de un degré et qu'on poursuit les passages.

2) Souche WR

En utilisant la même technique, nous avons sélectionné à partir de la souche WR 37°/21 un mutant "froid" qui a subi vingt passages échelonnés ainsi :

- dix passages à 30°C
- quatre passages à 29°C
- un passage à 27°C
- cinq passages à 25°C

Ce mutant est dénommé WR 25°/5.

B) Mutants thermorésistants ("chauds")

Pour obtenir des mutants thermorésistants nous avons utilisé une technique similaire à celle qui vient d'être décrite pour la sélection des mutants "froids", mais en effectuant les passages à températures régulièrement croissantes.

1) Souche VaMe

Jusqu'à 39,5°C il est relativement facile de sélectionner un mutant thermorésistant.

Un mutant "chaud" 39,5°/10 a ainsi été obtenu après trente-trois passages échelonnés comme suit :

- deux passages à 38°C
- vingt-et-un passages à 39°C
- dix passages à 39,5°C

A partir de 39,5°C, nous avons élevé la température d'incubation de

0,5°C seulement et avons réussi à sélectionner deux autres mutants thermorésistants comme cela est indiqué dans le tableau II.

Nombre de passages	Températures	VaMe 40°/21	VaMe 40,5°/13
	38°C	2	2
	39°C	21	21
	39,5°C	10	10
	40°C	21	10
	40,5°C	-	13

TABLEAU II. Mode de sélection des mutants "chauds" de la souche VaMe.

2) Souche WR

Un mutant "chaud" a été obtenu assez facilement à partir de la souche WR sauvage après les passages suivants :

- trois passages à 38°C
- vingt passages à 39°C
- neuf passages à 39,5°C
- douze passages à 40°C

Cette souche est dénommée WR 40°/12.

III. CARACTERES DES MUTANTS THERMOSENSIBLES ET THERMORESISTANTS.

Les souches thermosensibles et thermorésistantes sélectionnées ont été caractérisées d'une part en recherchant leur aptitude à se

développer à différentes températures, d'autre part en étudiant leur pouvoir pathogène.

A) Thermosensibilité comparée des mutants "froids" et "chauds".

Afin de caractériser les mutants "froids" et "chauds" obtenus à partir des deux souches VaMe et WR utilisées dans ce travail, nous avons procédé à une étude comparée de leur développement à températures infra et supra-optimales.

Nous avons d'abord éprouvé la capacité des mutants "froids" sélectionnés à former des plages à différentes températures.

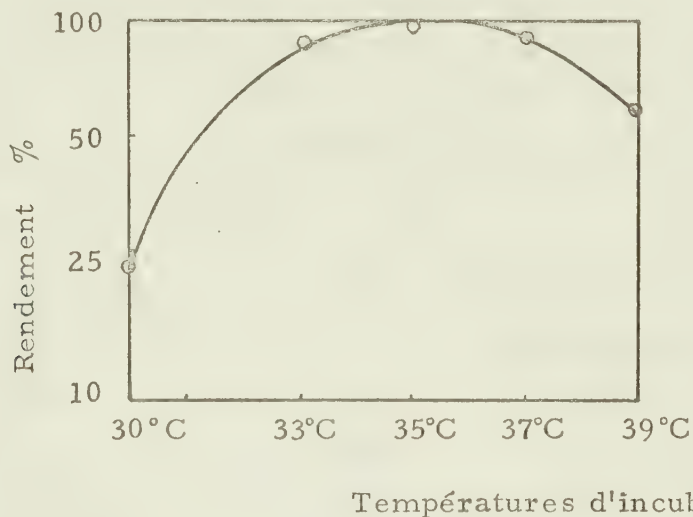


FIGURE 7. Formation des plages du mutant "froid" VaMe 25°/16 en fonction de la température d'incubation.
La lecture est effectuée vingt-neuf heures après l'inoculation d'une même dose de virus sur tous les tubes de titrage.

La figure 7 rapporte une expérience effectuée avec le mutant "froid" VaMe 25°/16. On voit que le nombre le plus élevé de plages formées sur cellules KB après vingt-neuf heures d'incubation est observé à 35°C. C'est donc cette température qui a été choisie pour les titrages, après que nous ayons vérifié qu'elle convenait également pour les souches d'origine. Les plages du mutant "chaud" ont été dénombrées après une

incubation de trente-cinq heures à 37°C. Pour la souche WR, le temps d'apparition des plages est plus long et la lecture des tubes de titrage est effectuée après quarante heures d'incubation à la température appropriée.

L'examen de la figure 8 montre que le mutant "froid" de la souche VaMe est plus sensible à l'effet des températures élevées que le mutant "chaud" ; en effet le développement du mutant "froid" est complètement inhibé à 40°C, alors que le mutant "chaud" se développe encore relativement bien à cette même température. Aux températures infra-optimales c'est le phénomène inverse qu'on observe : le mutant "froid" se développe bien à 30°C, alors que la formation des virions du mutant "chaud" est fortement inhibée.

Dans le tableau III sont rapportés les rendements obtenus à la vingt-neuvième heure avec les deux mutants de la souche VaMe au cours de deux expériences différentes.

Températures d'incubation	Souches de virus utilisées			
	VaMe 25°/16		VaMe 39,5°/10	
	Exp. A	Exp. B	Exp. A	Exp. B
37°C	100 p 100	100 p 100	100 p 100	100 p 100
39°C	41 p 100	60 p 100	57 p 100	80 p 100
40°C	1 p 100	1,5 p 100	6 p 100	6 p 100
30°C	30 p 100	46 p 100	2,1 p 100	3 p 100

TABLERAU III . Rendement final en virions (UFP/ml) du mutant "froid" et du mutant "chaud" de la souche VaMe en fonction de la température d'incubation.

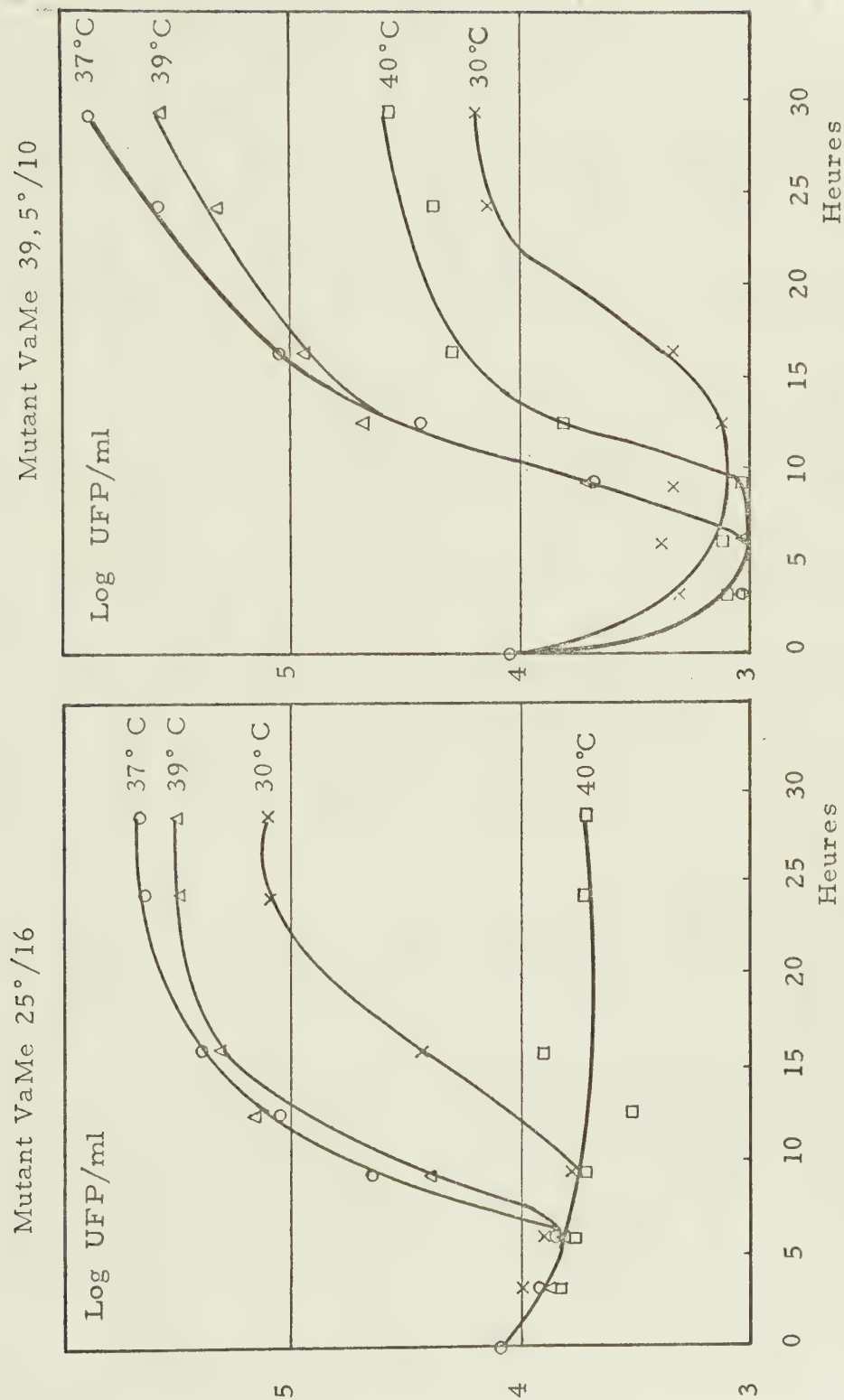


FIGURE 8. Cinétiques de développement des mutants "froids" VaMe 25°/16 et "chauds" VaMe 39,5°/10 en fonction de la température d'incubation.

Avec la souche WR on retrouve des résultats similaires comme en témoigne la figure 9 où sont inscrites les courbes de croissance en cycle unique obtenues avec la souche WR 25°/5 et la souche WR 40°/12 à 36 et à 40°C. Les rendements finaux à 40°C, pour le mutant "froid" et pour le mutant "chaud", sont respectivement de 0,1 et 13 pour 100.

Le tableau IV donne les résultats d'expériences comparatives faites sur la souche d'origine WR 37°/21 et le mutant "froid" WR 25°/5.

Températures d'incubation	Souches de virus utilisées			
	WR 37°/21		WR 25°/5	
	Exp. A	Exp. B	Exp. A	Exp. B
36°C	100 p 100	95 p 100	100 p 100	100 p 100
38°C	85 p 100	100 p 100	44 p 100	40 p 100
39°C	63 p 100	78 p 100	31 p 100	28 p 100
40°C	3 p 100	8,6 p 100	0,9 p 100	0,6 p 100

TABLEAU IV. Rendement final en virions (UFP/ml) de la souche d'origine WR 37°/21 et du mutant "froid" WR 25°/5 en fonction de la température d'incubation.

En reportant sur un graphique le rendement final obtenu à différentes températures et exprimé en pourcentage par rapport au rendement maximum obtenu à la température optimale, on peut tracer la courbe de la sensibilité du développement viral à la température (SDT) qui est caractéristique de chaque souche. LWOFF (4) a proposé une représentation simplifiée de la SDT, le "rt", qui est la température supra-optimale pour laquelle le rendement est diminué de 90 pour 100.

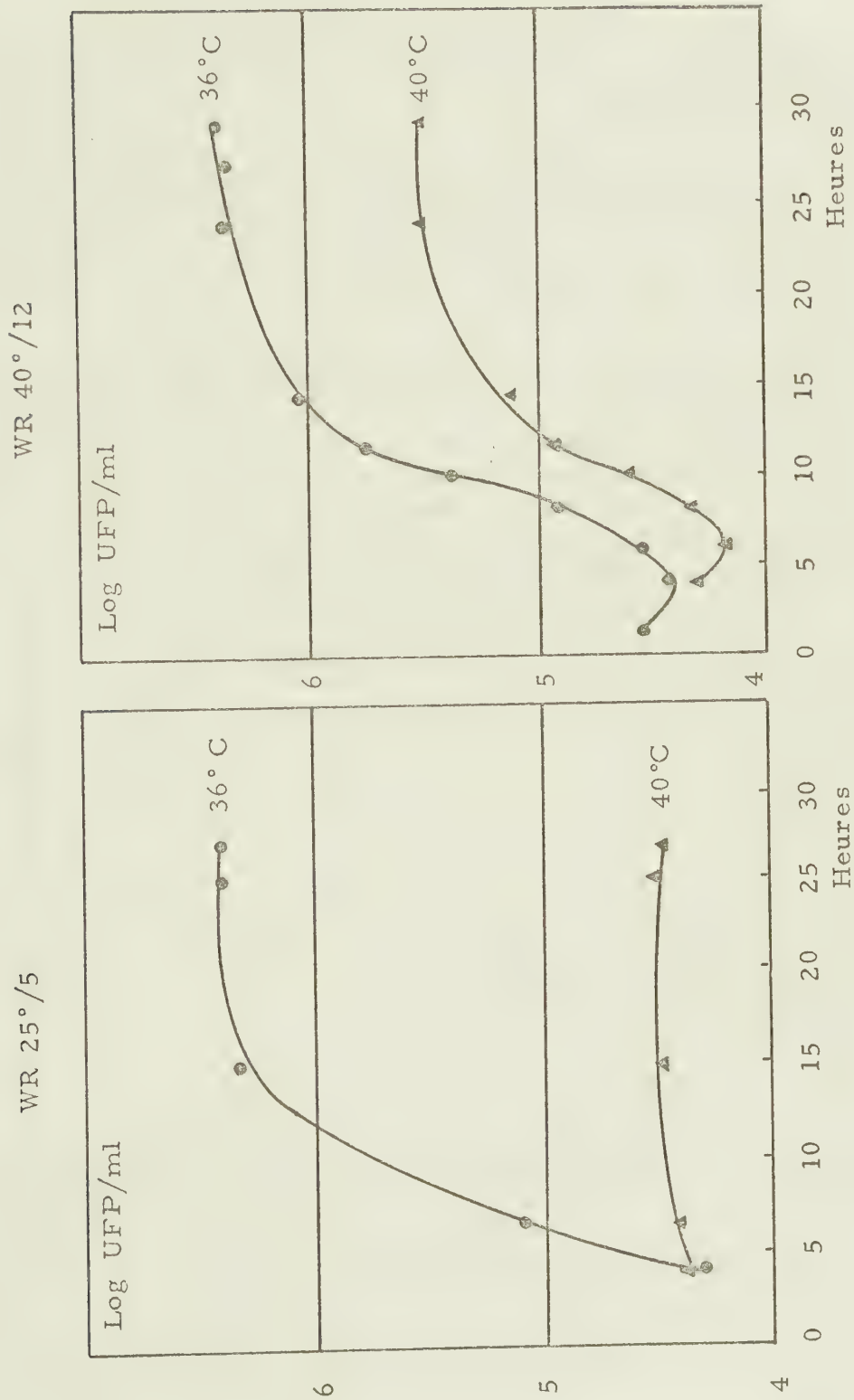


FIGURE 9 : Cinétiques de développement des mutants "froids" et "chauds" de la souche WR à 36 et à 40°C.

Sur les figures 10 et 11 sont représentées les courbes de sensibilité à la température des souches VaMe et WR d'origine et de leurs mutants "froids".

Le "rt" de la souche VaMe 37°/20 est de 39,8°C, alors que celui du mutant "froid" VaMe 25°/16 est de 39,2°C. Pour la souche WR 37°/21 et son mutant "froid" WR 25°/5, les "rt" s'établissent respectivement à 39,8 et à 39,1°C. Le "rt" du mutant "chaud" WR 40°/12 dont la courbe de SDT n'est pas représentée ici est supérieur à 40°C.

D'une expérience à l'autre, on peut noter des variations assez importantes dans les chiffres de rendement maximum obtenus. Cependant l'écart existant entre les "rt" de deux souches de thermosensibilité différente est toujours le même. C'est ainsi qu'on a retrouvé dans toutes les expériences un écart de 0,6°C entre la souche VaMe d'origine et son mutant "froid" et un écart de 0,7°C entre la souche WR 37°/21 et le mutant thermosensible WR 25°/5.

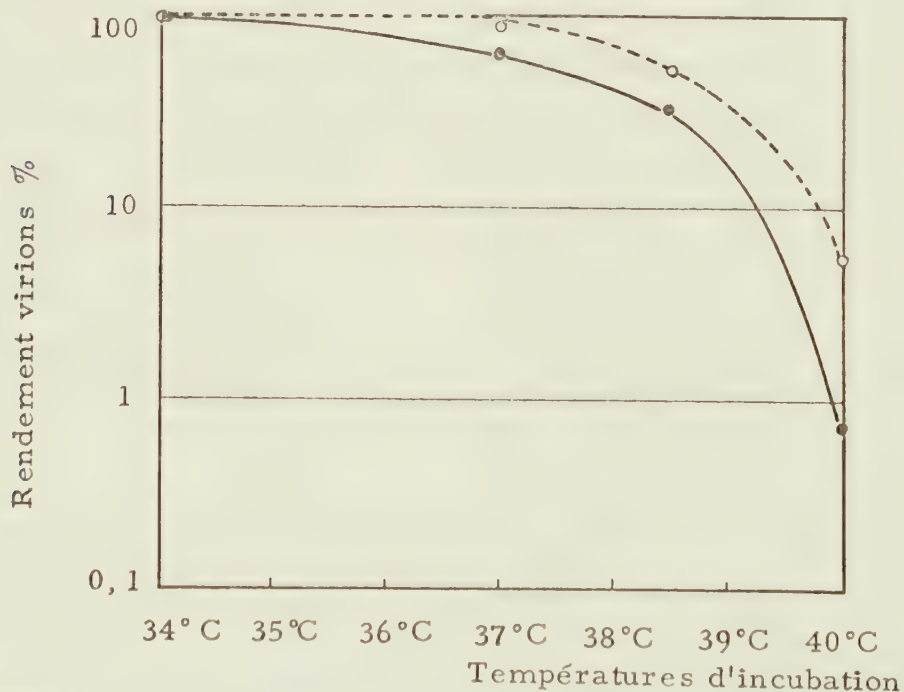


FIGURE 10. Sensibilité du développement viral à la température.

- Souche VaMe 37°/20.
- Mutant thermosensible VaMe 25°/16.

En examinant les figures 10 et 11, on s'aperçoit que les courbes qui expriment la thermosensibilité du développement des mutants "froids" sont décalées vers la gauche sur l'axe des températures par rapport à celles des souches d'origine. On voit également que la diminution de la thermorésistance s'accompagne d'une diminution de la psychrosensibilité.

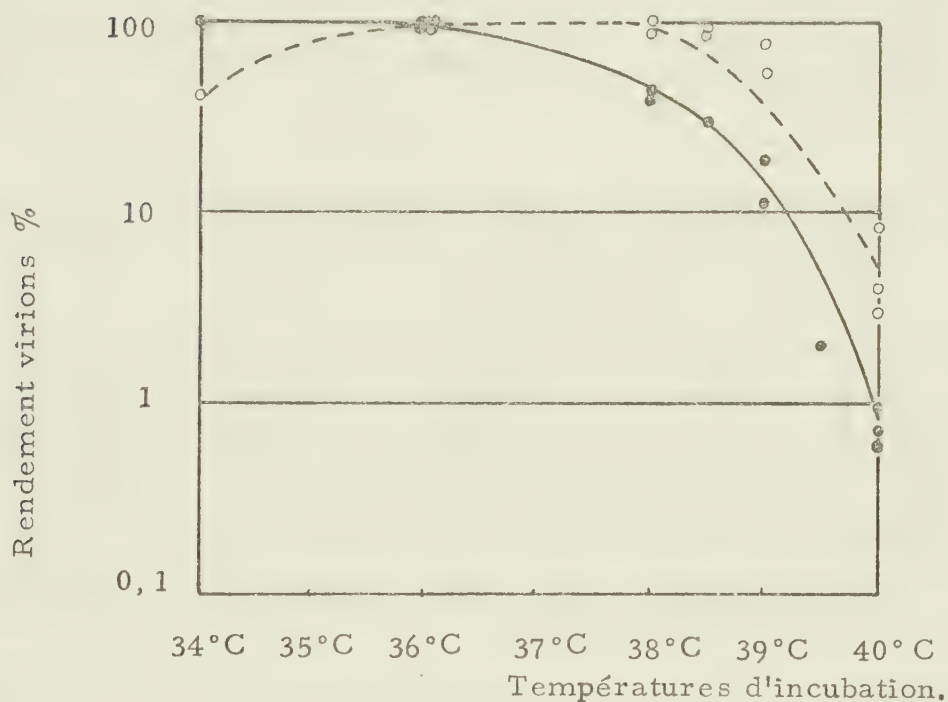


FIGURE 11. Sensibilité du développement viral à la température.

- Souche WR 37°/21
- Mutant thermosensible WR 25°/5.

B) Etude du pouvoir pathogène des mutants "froids" et "chauds" du virus vaccinal.

On sait que l'abaissement de la thermorésistance du développement du poliovirus conduit à une diminution du pouvoir pathogène, alors que son augmentation aboutit à une exaltation de la virulence (3, 50).

Nous avons cherché à savoir si les mêmes constatations pouvaient être faites avec le virus de la vaccine.

Pour cela nous avons utilisé la souche WR de préférence à la souche VaMe, cette dernière étant faiblement virulente pour les animaux de laboratoire.

1) Neurovirulence de la souche WR d'origine et de ses mutants "froids" et "chauds" chez la souris.

Le pouvoir pathogène pour la souris a été étudié par injection intracérébrale de 0,05 ml d'une dilution de virus à des animaux de 15 à 20 g. Dans ces conditions les premiers symptômes apparaissent entre le troisième et le septième jour selon la dose administrée. L'animal est prostré, blotti dans un coin de la cage, le poil hérissé, il présente soit des crises convulsives soit des paralysies du train postérieur. Si la dose de virus est suffisante, la mort survient entre le cinquième et le douzième jour après l'inoculation. Pour la souche WR d'origine et ses mutants "froids" et "chauds", nous avons déterminé la DL_{50} , c'est-à-dire la dose pour laquelle on observe la mort de 50 pour 100 des animaux : la DL_{50} de la souche d'origine s'établit à 20.000 UFP, celle du mutant "chaud" oscille entre 80 et 200 UFP alors que l'injection de 500.000 UFP de mutant "froid" ne déclenche aucun trouble pathologique.

2) Pouvoir pathogène pour le lapin.

a) Pouvoir dermo-infectieux.

L'inoculation de 20.000 UFP de la souche d'origine WR 37°/21 dans le derme du lapin provoque vers le troisième ou le quatrième jour l'apparition d'une tuméfaction inflammatoire. La peau est rouge, tendue, parfois hémorragique.

La réaction atteint son maximum le cinquième ou le sixième jour : la tuméfaction est dure, mobile et se couvre ensuite de pustules ; puis il se forme une escarre et la guérison intervient au bout de deux à trois semaines.

Afin d'aboutir à une expression quantitative de cet effet dermique, nous avons défini la DIM₅₀ qui correspond au plus petit nombre de particules infectieuses capables de provoquer chez 50 pour 100 des lapins une tuméfaction inflammatoire supérieure à 5 mm de diamètre. Pour la souche WR 37°/21 la DIM₅₀ est de 8.500 UFP, alors que les mêmes lésions sont observées avec 80 particules de mutant "chaud" et qu'il faut 350.000 UFP de mutant "froid" pour obtenir un effet identique.

Souches	"rt"	DL ₅₀ [°] Souris	DIM ₅₀ ^{°°} Lapin	DL °°° Lapin
WR 37°/21	39,8°	20.000 UFP	8.500 UFP	100.000 à 500.000 UFP
WR 40°/12	40°	80 à 200 UFP	80 UFP	500 à 1.000 UFP
WR 25°/5	39,1°	500.000 UFP	350.000 UFP	5.000.000 UFP

TABLEAU V. Virulence comparée des mutants "froids" et "chauds" de la souche WR chez la souris et le lapin.

- ° Inoculation intracérébrale de 0,05 ml d'une dilution de virus à la souris de quinze à vingt grammes.
- ° ° Inoculation intradermique de 0,1 ml d'une dilution de virus au lapin albinos de mille cinq cents à deux mille grammes.
- ° ° ° Inoculation intratrachéale de 1 ml d'une dilution de virus au lapin albinos de mille cinq cents à deux mille grammes.

b) Pouvoir pneumotrope.

L'inoculation intratrachéale de virus vaccinal (souche WR) produit une pneumonie caractéristique comme cela a été montré par ARMSTRONG et LILLIE (51). Cette maladie qui est accompagnée d'une

fièvre importante évolue vers la mort ou la guérison selon la dose injectée et la virulence de la souche. La dose létale par voie intratrachéale est de 100.000 à 500.000 UFP pour la souche d'origine, de 500 à 1.000 UFP pour le mutant "chaud" tandis qu'elle est supérieure à 500.000 UFP pour le mutant "froid".

Le tableau V résume l'ensemble de nos résultats.

Ainsi les passages effectués avec la souche WR à température infra-optimale conduisent à la sélection de mutants de thermosensibilité augmentée et de virulence atténuée, les passages à température supra-optimale aboutissent au contraire à la sélection de mutants de thermosensibilité diminuée et de virulence accrue. L'augmentation de la virulence est du même ordre de grandeur qu'elle soit mesurée par inoculation intracérébrale à la souris ou par inoculation intradermique ou intratrachéale au lapin.

De ces expériences on peut conclure que pour la souche WR du virus vaccinal il existe une corrélation entre thermorésistance et virulence.

IV. DETERMINATION DE LA PHASE DU DEVELOPPEMENT VIRAL SENSIBLE A LA TEMPERATURE.

Les résultats qui viennent d'être exposés montrent que les températures supra-optimales comme les températures infra-optimales bloquent le développement du virus vaccinal. Pour les souches thermorésistantes, les températures supra-optimales qui inhibent la multiplication sont plus élevées que pour les souches thermosensibles. L'inverse est vrai pour les températures infra-optimales.

On peut se demander si tout le cycle du développement viral est sensible à l'action des températures élevées ou si, comme c'est le cas pour le virus de la poliomyélite (LWOFF - 52 - 53), il existe un événement critique thermosensible. Pour répondre à cette question, nous avons effectué des expériences au cours desquelles nous avons fait agir les températures élevées soit sur la phase primaire, soit sur la phase secondaire du cycle de développement du mutant "froid" de la souche VaMe.

On désigne sous le nom de phase primaire la période de temps qui s'écoule entre l'infection des cellules et l'apparition des premiers virions néoformés, la phase secondaire étant la phase productrice de virions. Le mutant "froid" a été choisi de préférence à la souche sauvage afin de pouvoir utiliser des températures supra-optimales pas trop élevées (41°C) conduisant à l'inhibition totale du développement viral. En effet si les cellules KB sont placées à 42°C , elles montrent des signes évidents de souffrance au bout de quelques heures d'incubation.

De plus, nous avons adopté un inoculum de 4 UFP/cellule pour être dans de meilleures conditions d'adsorption, avoir une phase de latence aussi brève que possible et un début de développement viral qui s'amorce nettement.

A) Détermination de la durée de la phase primaire.

On sait depuis les travaux de SALZMAN (54) que la phase primaire du cycle de développement du virus vaccinal correspond à la période durant laquelle a lieu la replication du DNA viral. Cette phase précède l'apparition des premiers virions néoformés.

En ajoutant à différents moments un inhibiteur de la replication du DNA, comme la fluorodésoxyuridine (FUDR) et en mesurant le rendement en virions à la fin du cycle, on peut apprécier de façon indirecte la cinétique de synthèse du DNA viral. En effet, les virions produits ont été nécessairement formés à partir de DNA synthétisé avant l'adjonction de l'inhibiteur.

La figure 12 illustre une de ces expériences. On voit que jusque vers la quatrième heure, la vitesse de replication du DNA viral est élevée, qu'elle ralentit entre la quatrième et la sixième heure, et qu'elle atteint ensuite un plateau. On remarque également que cette phase de replication rapide du DNA précède de quatre heures la formation des virions.

On peut ainsi conclure que dans les conditions expérimentales utilisées la durée de la phase primaire est de six heures.

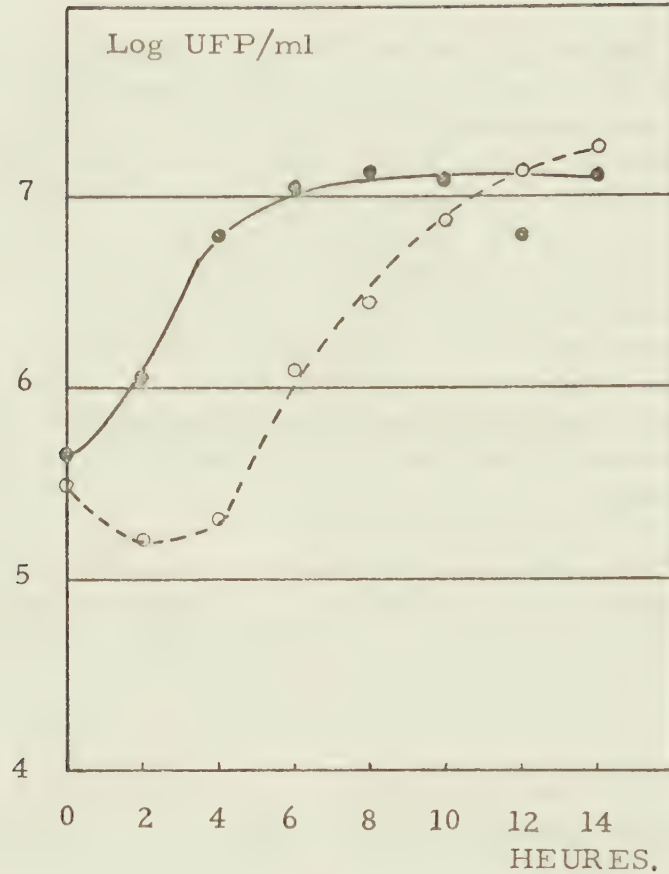


FIGURE 12. Replication du DNA viral et cinétique de développement du mutant "froid" VaMe 25°/16 sur cellules KB à 36°C.

- Adjonction de FUDR 10^{-5} M à différents moments du cycle (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 et 14 heures) et titrage des virions quinze heures après l'infection.
- Titrage des virions à différents moments du cycle.

B) Thermosensibilité de la phase primaire.

Pour étudier l'influence des températures supra-optimales sur la phase primaire du cycle de développement du mutant "froid" VaMe 25°/16 nous avons d'abord procédé à des incubations de durée variable à 41°C durant la phase primaire, suivies d'un transfert à 36°C jusqu'à la fin du cycle.

Les résultats d'une de ces expériences sont inscrits sur la figure 13.

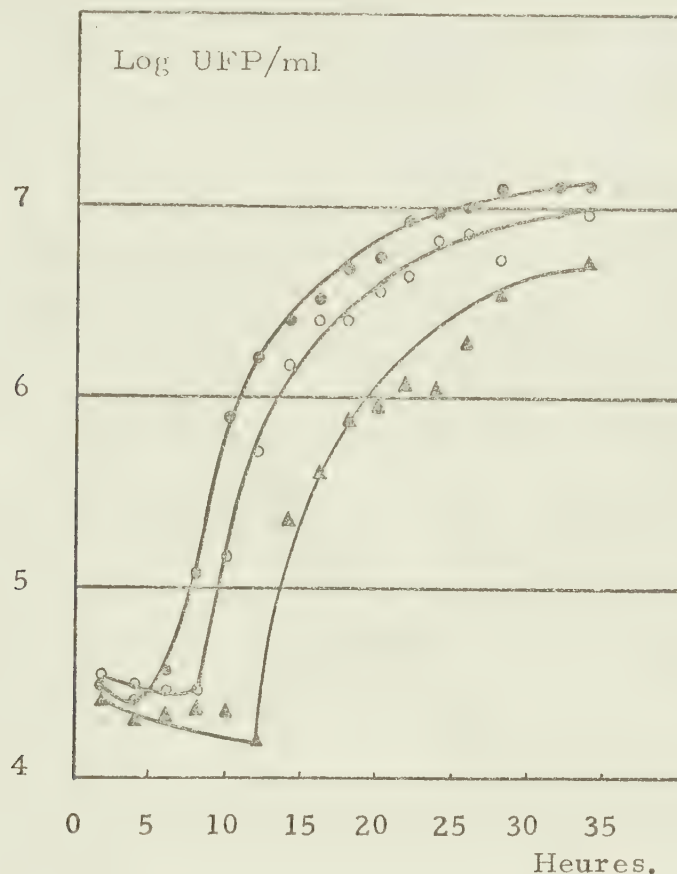


FIGURE 13. Effet d'un séjour de quatre heures et de huit heures à 41°C durant la phase primaire sur le développement du mutant "froid" VaMe 25°/16.

- Cellules infectées et maintenues à 36°C durant tout le cycle.
- Cellules infectées et maintenues quatre heures à 41°C puis transférées à 36°C.
- ▲ Cellules infectées et maintenues huit heures à 41°C puis transférées à 36°C.

On voit que lorsque les cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 séjournent durant les quatre premières heures à 41°C, le retard pour atteindre le titre de 1.10^6 UFP/ml sur un témoin incubé à 36°C est de deux heures. Par contre lorsque le séjour à 41°C est de huit heures, ce même titre n'est atteint que neuf heures plus tard. On note également que le rendement final en virions est d'autant

moins élevé que le temps passé à 41°C est plus long. Ces expériences démontrent que la phase primaire est sensible aux températures élevées.

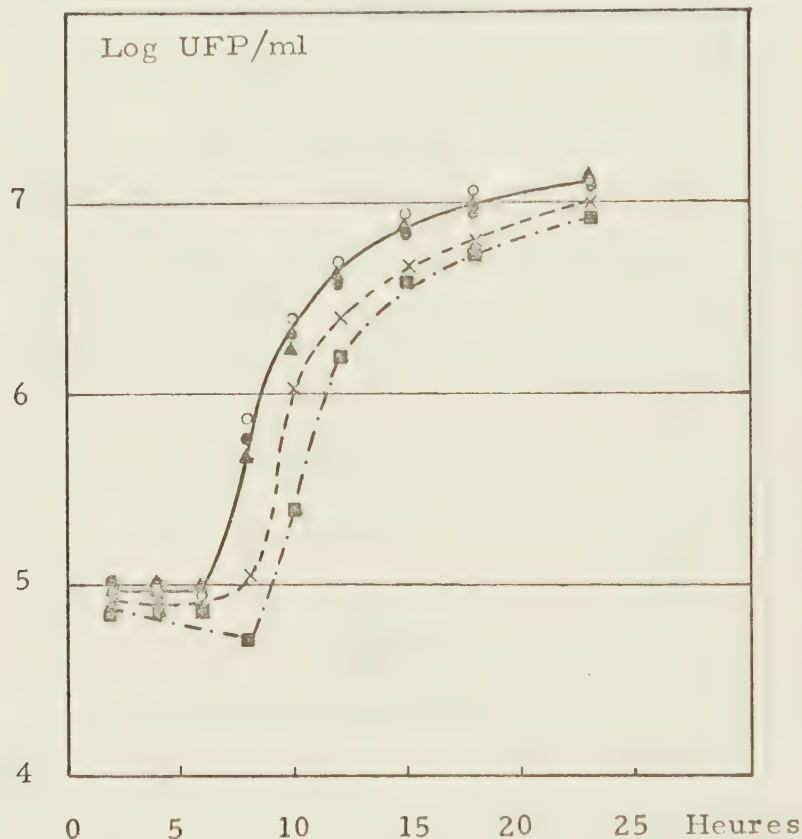


FIGURE 14. Effet d'un séjour de deux heures à 41°C à différents moments de la phase primaire sur le développement du mutant "froid" VaMe 25°/16.

- o Cellules infectées et maintenues à 36°C durant tout le cycle.
- ▲ 41°C de zéro à deux heures puis 36°C jusqu'à la fin du cycle.
- 41°C de la première à la troisième heure puis 36°C jusqu'à la fin du cycle.
- x 41°C de la deuxième à la quatrième heure puis 36°C jusqu'à la fin du cycle.
- 41°C de la quatrième à la sixième heure puis 36°C jusqu'à la fin du cycle.

On peut se demander si la totalité de la phase primaire est thermosensible. Pour répondre à cette question, nous avons procédé à des incubations fractionnées de deux heures à 41°C pendant les six premières heures du cycle. Les résultats sont schématisés sur la figure 14.

Il apparait qu'une incubation à 41°C entre zéro et deux heures et entre une et trois heures après l'infection ne modifie pas l'allure des courbes de croissance qui sont superposables à celle d'un témoin qui a séjourné pendant toute l'expérience à 36°C.

Par contre, pour un séjour à 41°C de la deuxième à la quatrième heure, le titre de 1.10^6 est atteint avec un retard de une heure environ, alors que si le passage à 41°C est effectué de la quatrième à la sixième heure, ce retard est de trois heures.

Ces expériences nous permettent de conclure que c'est essentiellement la seconde moitié de la phase primaire qui est sensible à l'effet des températures élevées.

C) Thermosensibilité de la phase secondaire.

1) Effet d'un transfert à 41°C sur la production des virions pendant la phase secondaire.

En maintenant des cultures KB infectées avec le mutant "froid" à 36°C pendant la phase primaire et en effectuant des transferts à 41°C à différents moments de la phase secondaire, on s'aperçoit que le développement viral est rapidement arrêté. L'examen de la figure 15 montre que la totalité de la phase secondaire est sensible aux températures élevées : en effet chaque fois que le transfert à 41°C est effectué entre la huitième et la vingtième heure, la production des virions est immédiatement stoppée.

2) Etude comparée du blocage du développement du mutant "froid" par le FUDR et par un transfert à 41°C.

La courbe obtenue en transférant des cultures infectées à 41°C à différents moments du cycle et en titrant les virions à la quinzième heure s'identifie à la courbe du développement viral. Même si

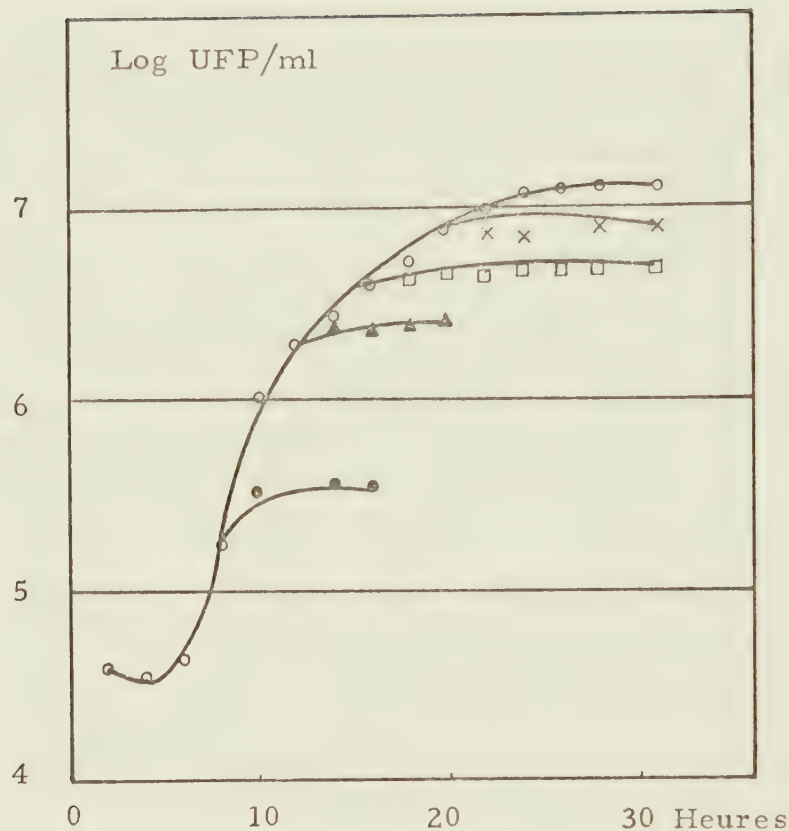


FIGURE 15. Effet d'un transfert à 41°C à différents moments de la phase secondaire sur le développement du mutant "froid" VaMe 25°/16.

- o Cellules infectées et maintenues à 36°C durant tout le cycle.
- Transfert à 41°C à la huitième heure après l'infection.
- ▲ Transfert à 41°C à la douzième heure après l'infection.
- Transfert à 41°C à la seizième heure après l'infection.
- x Transfert à 41°C à la vingtième heure après l'infection.

la synthèse du DNA viral est complète vers la sixième heure, comme cela apparaît sur la figure 16, le développement viral est complètement bloqué après une incubation à température élevée. Cette expérience démontre que la phase secondaire est sensible à l'effet des températures supra-optimales.

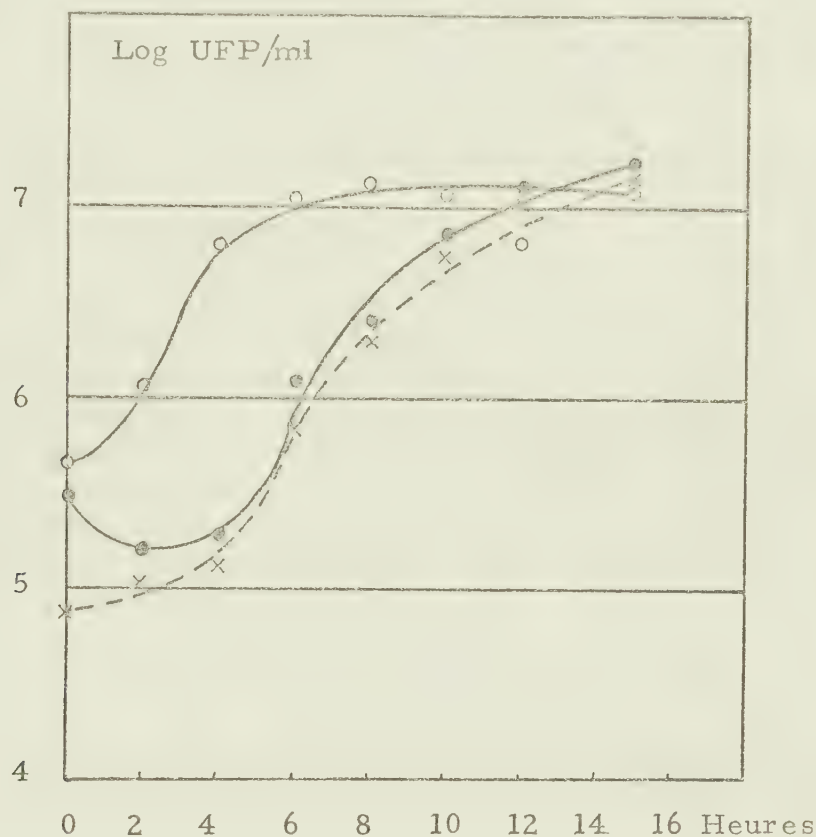


FIGURE 16. Effet comparé d'un transfert à 41°C et de l'inhibition de la synthèse du DNA viral par adjonction de FUDR à différents moments du cycle de développement du mutant "froid" VaMe 25°/16 sur la formation des virions.

- Adjonction de FUDR 10^{-5} M à différents moments du cycle et titrage des virions quinze heures après l'infection.
- x Transfert à 41°C à différents moments du cycle jusqu'à la quinzième heure et titrage des virions quinze heures après l'infection.
- Titrage des virions à différents moments du cycle.

3) Etude morphologique en microscopie électronique du développement du mutant "froid" VaMe 25°/16 à températures optimale et supra-optimale.

Il nous a semblé intéressant de rechercher quel était l'effet d'un passage à température supra-optimale à différents moments du cycle de développement sur la morphogénèse des virions. Cependant, avant d'entreprendre ce travail, il convient d'étudier le développement du mutant "froid" VaMe 25°/16 sur cellules KB à température optimale.

a) Aspects morphologiques de l'infection des cellules KB à 36°C.

Dès la troisième heure après l'infection, comme le montrent les photos 1, 2 et 3 de la planche I, on peut distinguer dans le cytoplasme des cellules infectées et maintenues à 36°C des formations arrondies qui sont constituées par du matériel dense et granulaire. Ce sont dans ces viroplasmes ou "factories" des auteurs anglo-saxons que va se dérouler la morphogénèse des virions. Ces viroplasmes qui se trouvent au voisinage du noyau sont entourées de nombreuses mitochondries et de ribosomes. On constate qu'ils augmentent de taille en fonction du temps.

Entre la troisième et la sixième heure, des membranes incomplètes en forme de calottes et de demi-sphères apparaissent dans les viroplasmes. (Planche I - photos 4 et 5). Peu à peu celles-ci circonscrivent le matériel du viroplasma pour former des particules rondes et bien délimitées (planche I - photos 3 et 5) au sein desquelles il se produit une condensation du matériel interne qui conduira à la formation du nucléoïde (Planche I - photos 6 et 8).

A partir de la dixième heure, le nucléoïde s'allonge et prend la forme d'une haltère qui se creuse d'une cavité centrale (Planche I - photos 9 et 10). Les virions dont la morphogénèse est achevée quittent le viroplasma et se rapprochent de la membrane cellulaire (Planche II - photos 13 et 19). Au cours du temps on observe de plus en plus de formes sphériques complètes ou encore incomplètes (Planche II - photos 11 - 16 - 17 et 18). La photo 15 de la planche II montre nettement la structure des virions néoformés : on distingue très bien la nucléocapside en forme d'haltère ainsi que les membranes qui l'entourent.

De la dixième à la vingt-quatrième heure, on peut voir dans une même

cellule tous les stades de la morphogénèse : les photos 9 et 19 montrent d'une part des particules sphériques immatures dont certaines présentent un nucléoïde et d'autre part des formes mures qui ont migré vers l'extérieur.

Il faut noter qu'à 36°C dans les conditions expérimentales utilisées toutes les cellules présentent des signes morphologiques d'infection virale.

b) Aspects morphologiques de l'infection des cellules KB à 41°C.

Dans les cellules infectées et maintenues à 41°C on ne rencontre que très rarement des particules virales. Dans quelques cellules on peut observer une amorce de développement viral.

La planche III montre quelques images rencontrées à température supra-optimale. Un certain nombre de formes immatures sont vides (photos 1 et 2). Sur la photo 3 apparaissent des ébauches de membranes. Sur les nombreuses préparations examinées nous n'avons pratiquement jamais rencontré de virions murs.

Cela indique qu'il n'y a pas d'accumulation d'unités de structure lorsque les cellules sont incubées à 41°C durant tout le cycle et que le développement est complètement bloqué.

c) Etude en microscopie électronique d'un transfert à température supra-optimale à différents moments du cycle.

Pour étudier l'influence d'un transfert à 41°C sur la morphogénèse des virions, il convenait de se placer dans les conditions où l'on pouvait observer tous les stades du développement viral. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi d'effectuer ces transferts relativement tôt après l'infection (trois heures et quatre heures trente) et d'observer les cellules après trois heures d'incubation supplémentaire soit à température optimale soit à température supra-optimale.

Les planches IV et V résument l'ensemble des résultats obtenus.

Les photos 1, 2, 3 de chaque planche montrent les stades de la morphogénèse observés après trois et quatre heures trente d'incubation à 36°C : des viroplasmes entourés de polyribosomes sont apparus et on peut y disti

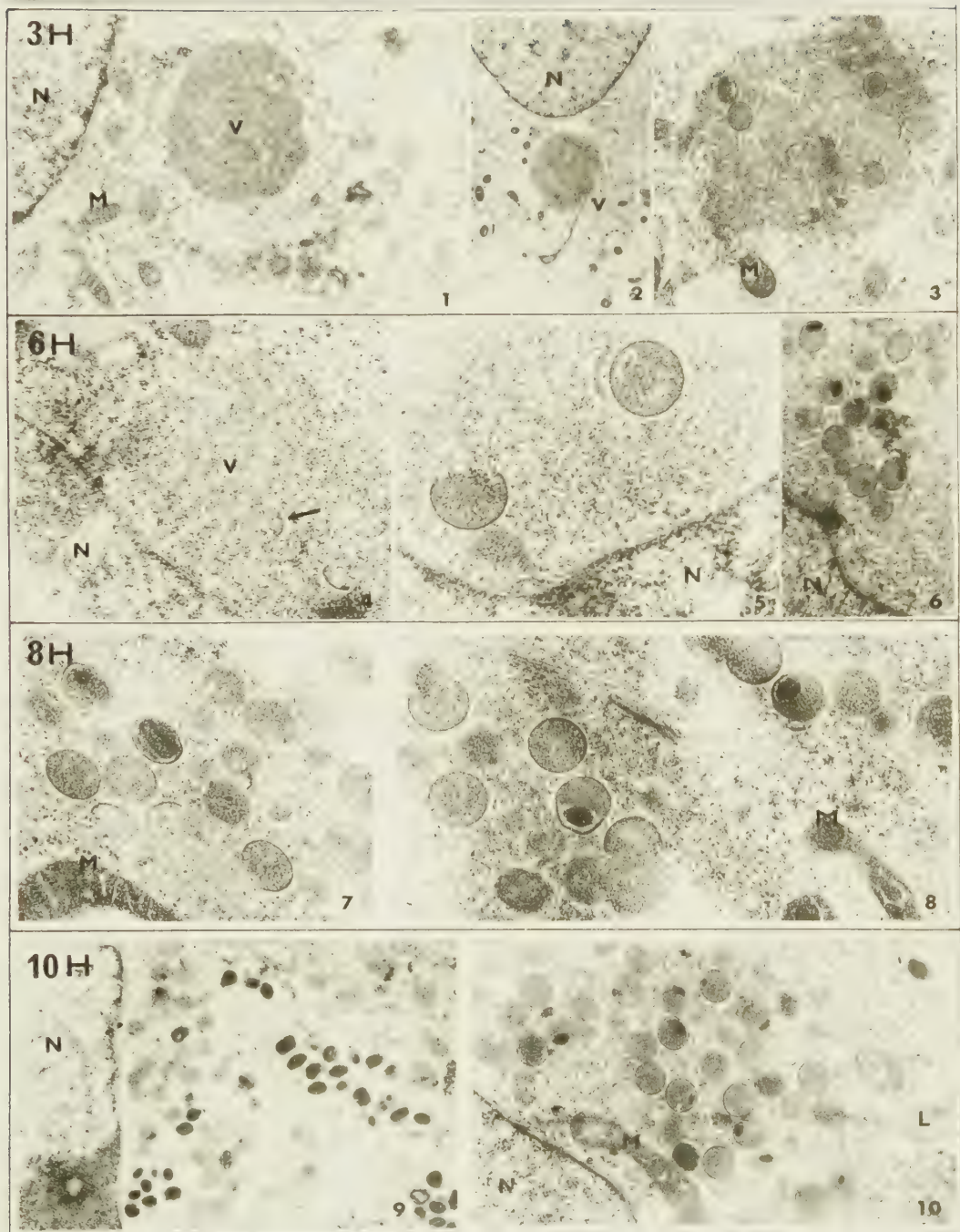
guer quelques formes incomplètes assez petites.

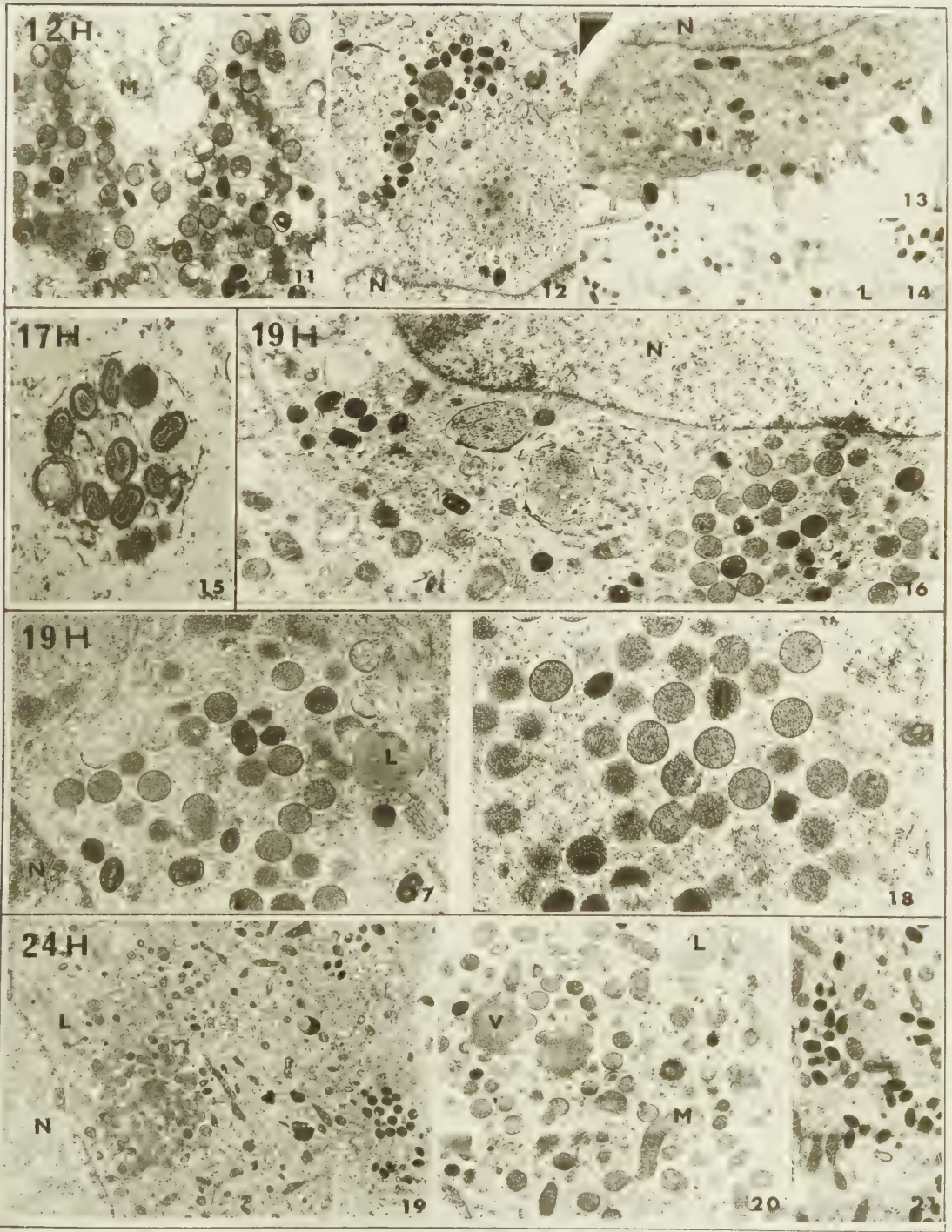
Sur les photos 7 et 8 de la planche IV et sur les photos 7, 8, 9 de la planche V. on voit les stades atteints après une infection de six et huit heures à 36°C : les particules immatures avec et sans nucléoïde sont beaucoup plus nombreuses et on observe déjà quelques virions néoformés.

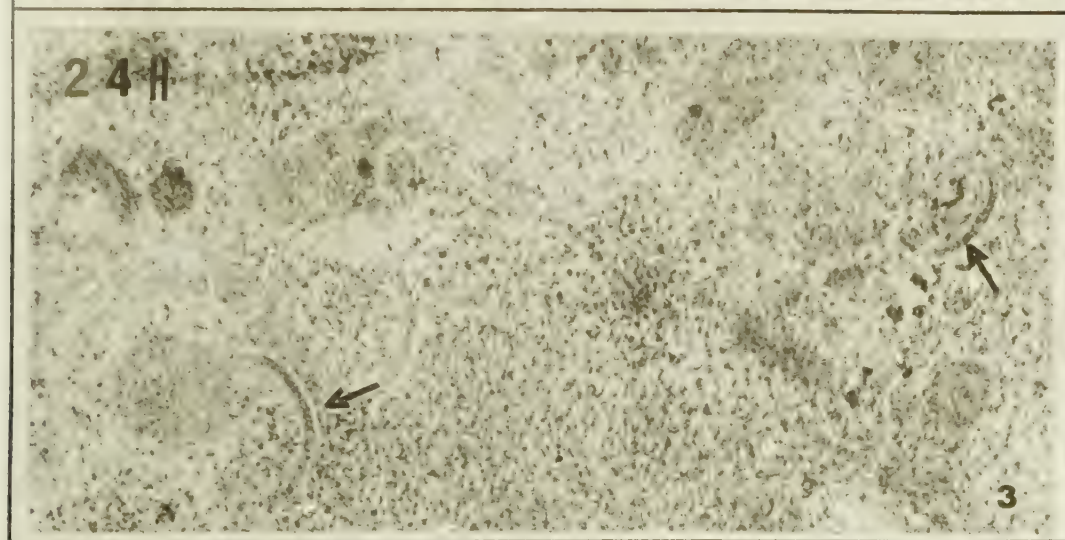
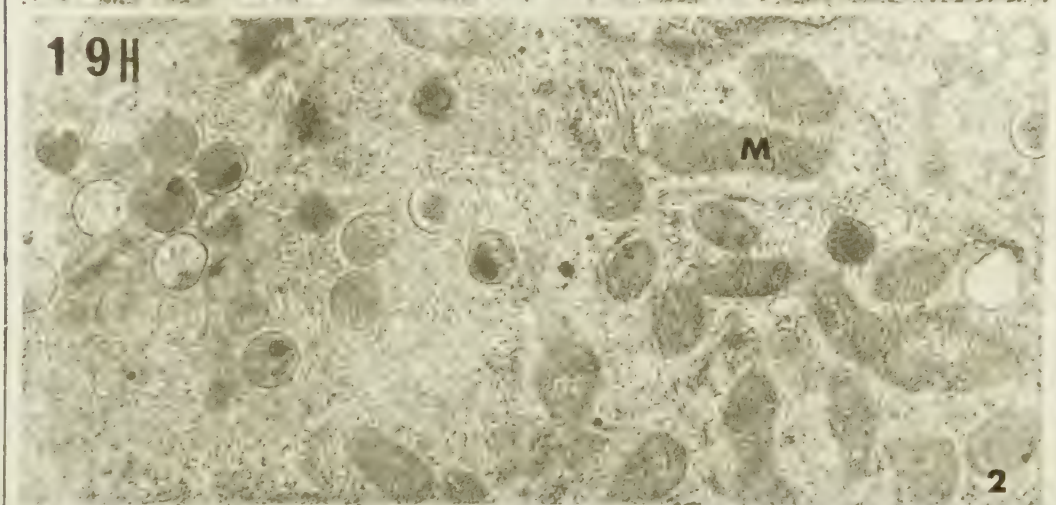
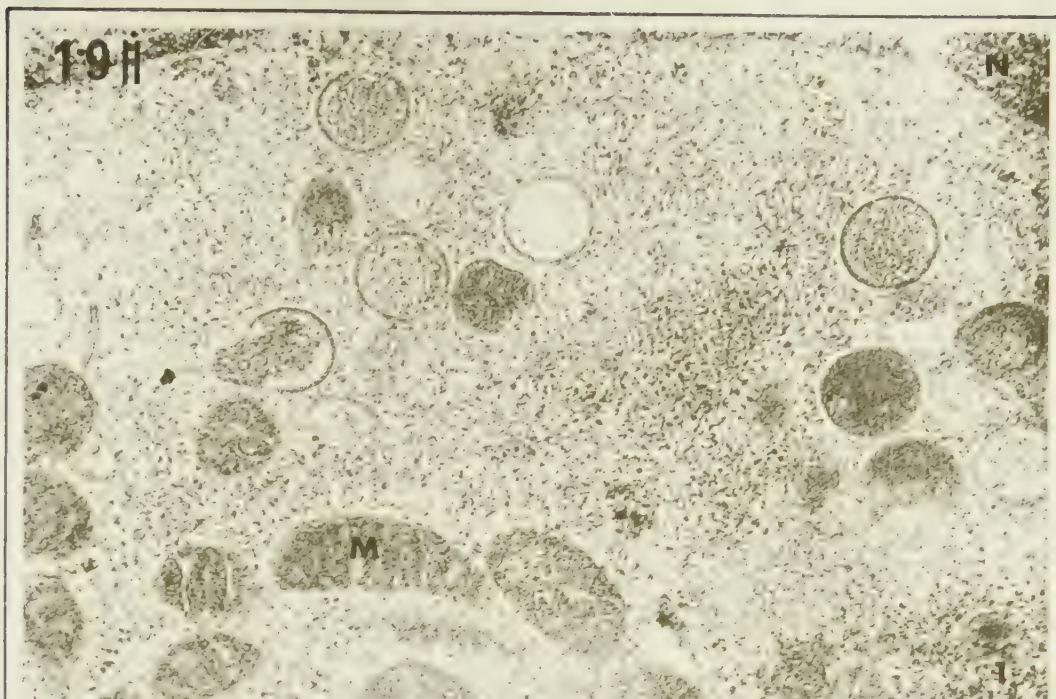
Quant aux cultures qui ont été transférées à 41°C, trois heures ou quatre heures trente après l'infection à 36°C, elles ne montrent aucune évolution conduisant à la maturation des virions : dans les viroplasmes qui paraissent beaucoup plus denses il ne s'est formé aucune nouvelle structure. Il convient de remarquer également que les viroplasmes des cellules transférées à 41°C ne sont pas circonscrits par des polyribosomes (photos 4, 5 et 6 de chaque planche).

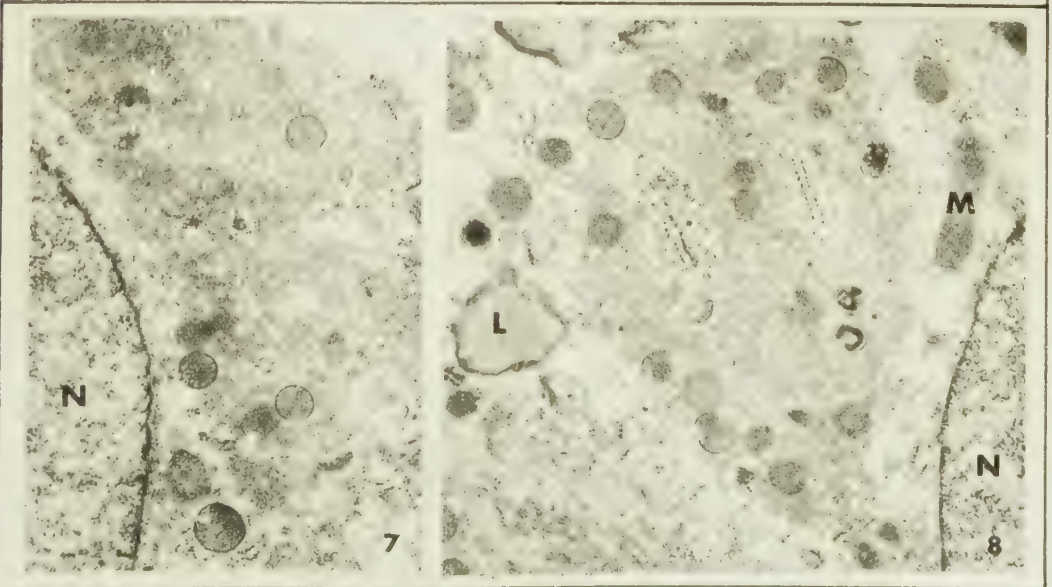
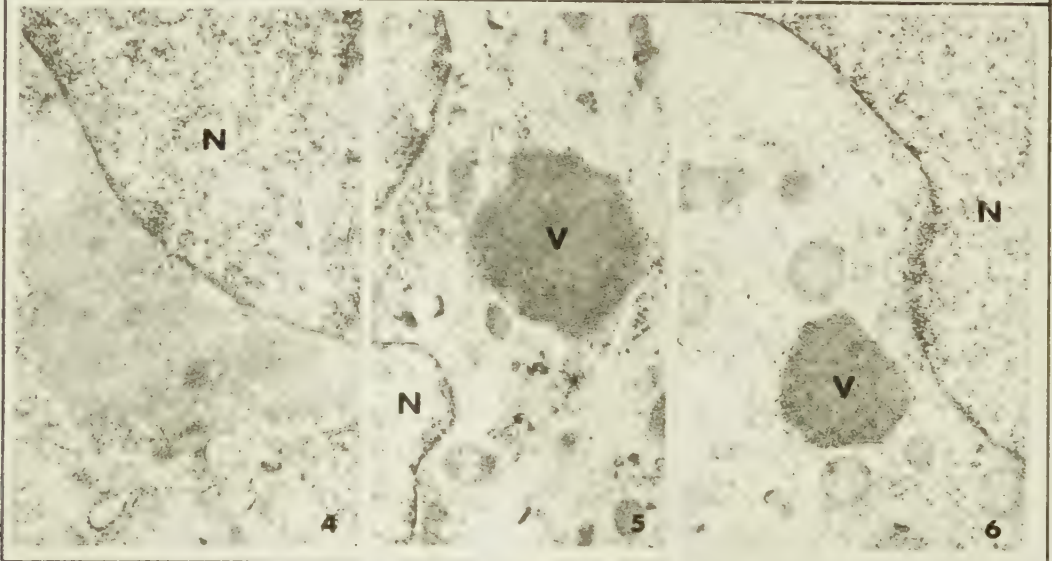
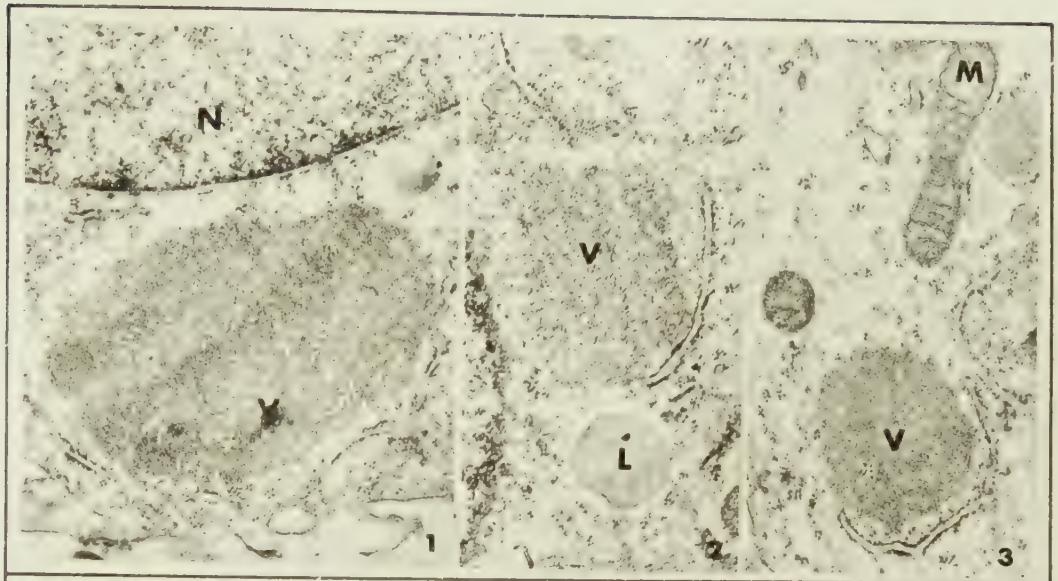
Cette étude au microscope électronique confirme les résultats exposés plus haut en démontrant que les températures supra-optimales agissent également sur la phase secondaire du cycle de développement.

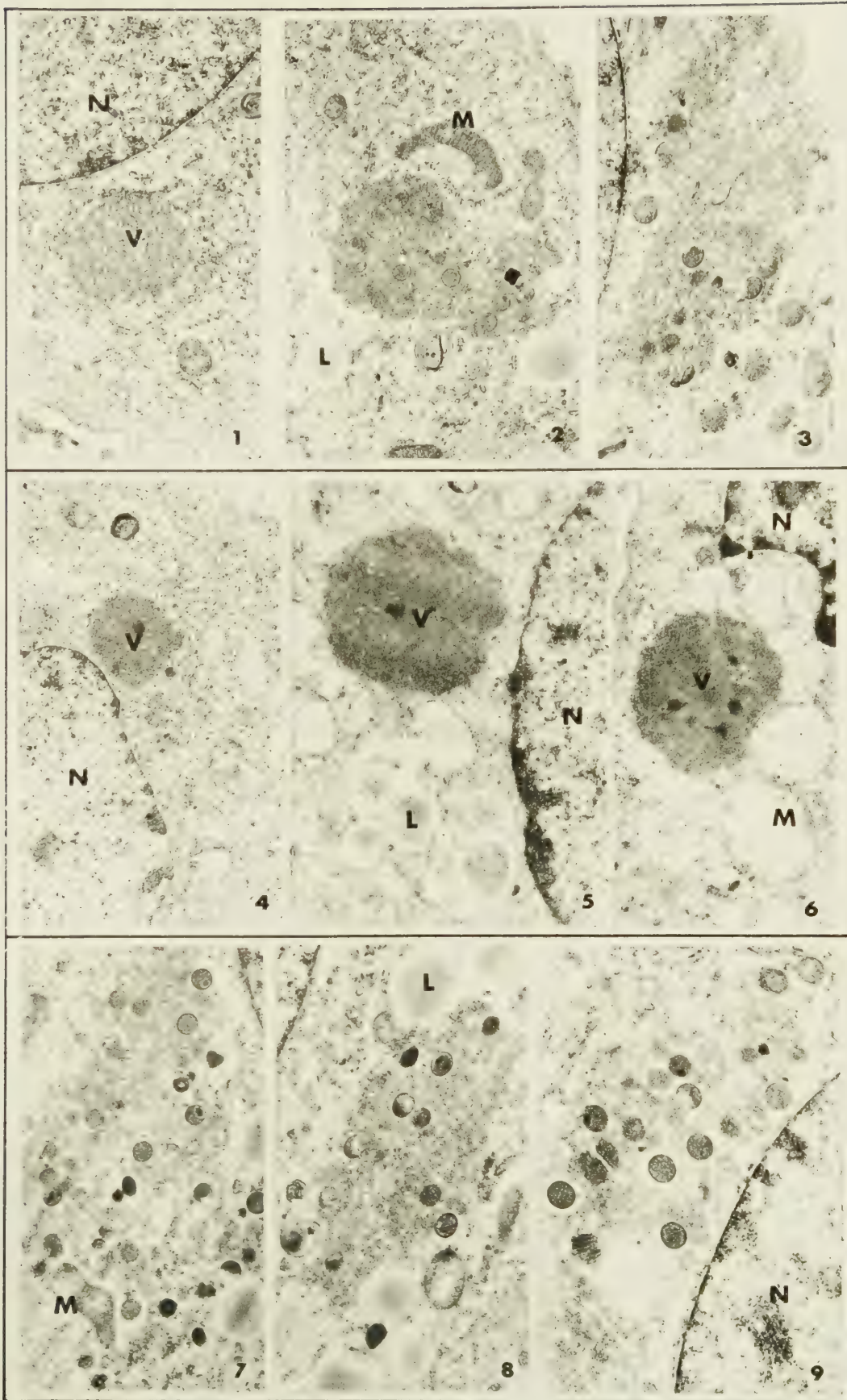
x
x x











D I S C U S S I O N

Les premiers travaux sur le développement du virus de la vaccine datent de 1950 et ont été entrepris à l'aide d'oeufs embryonnés ou de cultures stationnaires de différents types de cellules.

C'est ainsi que BRIODY et STANNARD (55), ANDERSON (56), MAITLAND et TOBIN (57) ont étudié la multiplication du virus vaccinal sur la membrane chorioallantoïdienne de l'oeuf de poule, CRAWFORD et SANDERS (58) sur des cellules épidermiques de lapin, MAITLAND et MAGRATH (59), OVERMAN et TAMM (60) sur des cultures de membrane chorioallantoïdienne.

Quelques années plus tard, pour analyser de façon plus précise les différentes phases du cycle de développement, en particulier pour mettre en évidence une phase d'éclipse, des cultures en suspension ont été utilisées : cellules d'embryon de poulet (MAITLAND et MAGRATH - 59), cellules de rein de singe (FURNESS et YOUNGNER - 61) et cellules L (SMITH et SHARP - 62).

Ces recherches ont montré que la période d'éclipse dure huit à dix heures, que la croissance des particules infectieuses se fait de façon exponentielle et que le rendement peut atteindre 300 UFP/cellule vingt-quatre heures après l'infection.

C'est à EASTERBROOK (63) que revient le mérite d'avoir effectué les premières expériences en cycle unique. Dans les conditions où cet auteur s'est placé, 50 à 60 pour 100 de l'inoculum est adsorbé en trente minutes, un simple lavage élimine les virions non adsorbés et la multiplication virale est limitée à un seul cycle.

Au cours du développement viral EASTERBROOK a décrit trois phases caractéristiques :

- entre zéro et cinq heures après l'infection le titre infectieux baisse, ce qui correspond à la phase d'éclipse.
- entre cinq et dix heures, le titre augmente de façon exponentielle.
- de la dixième à la trentième heure, l'augmentation est plus lente.

L'allure de la courbe de croissance de la souche VaMe 37°C est identique à celle rapportée par EASTERBROOK. Nous retrouvons les trois périodes caractéristiques du développement des virions. La souche WR présente une multiplication plus lente ce qui se traduit d'ailleurs par un temps d'apparition des plages plus long. Notons qu'au cours de nombreuses expériences effectuées, l'allure des courbes de développement a toujours été remarquablement constante et reproductible.

Les températures supra-optimales inhibent la multiplication du virus vaccinal. Pour la souche VaMe, par exemple, pour laquelle le développement est maximum entre 34 et 37°C le rendement final n'est plus que de 38 pour 100 à 39°C et de 6 pour 100 à 40°C. Au fur et à mesure qu'on augmente la température d'incubation, la vitesse de développement ralentit. Des résultats semblables ont été obtenus avec la souche WR.

L'action de la température sur la multiplication des virus a donné lieu à la publication de nombreux travaux tant dans le domaine des virus animaux que dans celui des virus végétaux.

SIGURDSSON (64) montre que le rendement du virus de la stomatite vésiculeuse à 40°C est plus de 100 fois inférieur à celui obtenu à 36°C. BEDSON et DUMBELL (9) ont défini pour certains pox virus les températures supra-optimales ("ceiling temperatures") pour lesquelles aucune pustule n'apparaît sur la membrane chorioallantoïdienne de l'oeuf de poule.

A. LWOFF (1) a montré que la multiplication du poliovirus est inhibée à température élevée : à 40°C, le rendement est de deux-cent-cinquante fois plus faible qu'à 37°C.

L'adénovirus 5 est également sensible à l'action des températures supra-optimales : il ne se développe avec un rendement maximum qu'entre d'étroites limites de températures (36 - 38°C), et à 41°C son rendement n'est plus que de 0,01 pour 100 (SAMAILLE et WAROCQUIER - 65).

GEVAUDAN (66) a noté que le rendement du virus coxsackie à 39,5°C est mille fois inférieur à celui obtenu à 37°C.

L'influence des températures supra-optimales sur le développement d'autres virus a également été étudiée par d'autres auteurs, qui sont arrivés aux mêmes conclusions : M. LAB (67) pour le virus sindbis, STEVENS et JACKSON (68) pour le virus de l'herpès et CRUICKSHANK et BEDSON (69) pour le virus de la variole.

Quant aux virus végétaux, le virus de la mosaïque du tabac (VMT) a été étudié par LEBEURIER (70 - 71 - 72) et par LEBEURIER et HIRTH (73 - 74) : la température optimale de développement est de l'ordre de 24°C ; à des températures supérieures, on note une diminution de la production d'antigènes d'autant plus marquée que la température est élevée : à 34°C le rendement n'est plus que de 10 pour 100 de celui obtenu à 24°C.

Aux températures infra-optimales, le développement viral est également inhibé. L'examen des courbes obtenues montre que la vitesse de développement est plus lente, que la phase de latence est plus longue et que le rendement final est diminué. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par LWOFF (5) avec le poliovirus, par BOUDREAULT (75) avec le virus grippal et par GEVAUDAN (66) avec le virus coxsackie.

Ainsi l'inhibition du développement viral par les températures infra- et supra-optimales est un phénomène général. En rapportant le rendement final en virions obtenus à différentes températures au rendement maximum observé à température optimale, on peut tracer la courbe de sensibilité du développement à la température (SDT) spécifique de chaque souche de virus. Les caractéristiques de cette courbe ont été étudiées par GROMAN et collaborateurs (50) pour le poliovirus. Ces auteurs ont montré que la courbe présente une partie horizontale correspondant à une zone très étroite de températures où le développement est maximum, et de part et d'autre une partie descendante où la multiplication des virions est inhibée par les températures infra- et supra-optimales.

Pour obtenir une reproduction simplifiée de la thermosensibilité d'une souche virale donnée, A. et M. LWOFF ont défini le "rt" (rendement température) qui est la température supra-optimale pour laquelle le rendement est diminué de 90 pour 100.

GEVAUDAN (66) en vue d'aboutir à une notation plus précise englobant également la psychrosensibilité, propose d'utiliser un "rt⁺" pour la température infra-optimale où le rendement est diminué de 90 pour 100 et un "rt⁻" pour la température supra-optimale où le rendement est diminué de 90 pour 100. Cet auteur souligne d'autre part que pour être complet il conviendrait d'indiquer la température optimale du développement.

On peut se demander si des modifications du métabolisme cellulaire à température élevée ne seraient pas responsables de l'inhibition du développement viral. Cette hypothèse peut être écartée en regard des résultats obtenus avec les mutants "chauds".

A. et M. LWOFF (3) montrent qu'à température supra-optimale les souches "chaudes" du virus de la poliomyélite se développent parfaitement bien sur cellules KB alors que les souches "froides" sont inhibées. Il en

est de même avec le mutant "chaud" isolé à partir de la souche vaccinale VP provenant d'une lymphé commerciale (M. LAB - communication personnelle). Pour sa part, Roberte BEAUTEEMS (76) observe que la vitesse de croissance d'un mutant "chaud" du virus sindbis à température supra-optimale est supérieure à celle de la souche sauvage et que son rendement à 40°C est plus élevé sur cellules de souris que celui observé avec la souche sauvage à la même température.

Cependant, l'influence de la température sur le métabolisme de la cellule doit être pris en considération dès que l'on compare la thermosensibilité d'une souche sur deux systèmes cellulaires différents.

Dans un récent travail portant sur le virus sindbis, M. LAB et A. KIRN (77) ont montré que la sensibilité du développement viral à la température est fonction d'une part de la thermosensibilité propre de chaque souche de virus et d'autre part du système cellulaire utilisé. Ils ont constaté en effet que la souche thermorésistante du virus sindbis se développe mieux à température élevée que la souche sauvage et que l'écart entre les deux "rt" est le même sur les deux types de cellules. Cela démontre le rôle joué par le génome viral. Cependant, sur fibroblastes de poulet, le rendement à température supra-optimale est plus élevé que sur cellules de souris quelle que soit la thermosensibilité de la souche de virus. Ils en concluent qu'il existe une participation cellulaire dans l'inhibition de la multiplication des virus par les températures supra-optimales, ce qui les conduit à proposer de représenter la thermosensibilité du développement viral par le "rt" suivi d'une indication sur le type de cellules avec lequel les expériences ont été effectuées. Nous avons observé pour notre part que sur cellules KB le "rt" de la souche "froide" du virus vaccinal est de 39,2°C alors que sur cellules rénales de fœtus de veau il est de 40,3°C.

Il convient également d'éliminer la possibilité d'une inactivation des particules virales à température supra-optimale.

Une telle inactivation semble peu probable. En effet, nous avons constaté qu'au bout de vingt-quatre heures de séjour à 41°C, la baisse du titre d'une suspension de virus vaccinal n'est que de 3 pour 100 par rapport à la valeur d'un témoin ayant séjourné dans les mêmes conditions à 37°C. Jean-Bernard MICHEL (78) a montré qu'il n'existe pas de différence de résistance à l'inactivation thermique entre mutants "froid" et "chaud" du virus de la vaccine, et la stabilité des suspensions de poliovirus à 41°C a été démontrée d'autre part par LWOFF (3).

Par des passages successifs à températures décroissantes, nous avons sélectionné des mutants thermosensibles pouvant se développer à 25°C, et, inversement par des passages à températures croissantes, des mutants thermorésistants se développant à 39°C et au delà.

Les mutants isolés à basses températures se développent moins bien à températures élevées que les souches d'origine : le mutant WR 25°/5 a un rendement de 40 pour 100 à 38°C, de 28 pour 100 à 39°C et de 0,6 pour 100 à 40°C, alors que les rendements de la souche d'origine WR 37°/21 sont respectivement de 100 pour 100 à 38°C, de 78 pour 100 à 39°C et de 8,6 pour 100 à 40°C.

Lorsqu'on s'adresse aux températures infra-optimales, on observe l'inverse : la souche sauvage est beaucoup plus sensible aux températures basses que le mutant "froid". A 34°C, par exemple, le rendement de la souche WR 25°/5 est de 100 pour 100, alors que celui de la souche d'origine est de 39 pour 100. A 31°C l'inhibition est encore plus accusée : elle est en effet de 90 pour 100 pour la souche d'origine, alors que le mutant "froid" possède un rendement voisin du rendement maximum.

Quant aux mutants "chauds", ils se développent mieux à températures élevées que les souches sauvage et "froide", mais sont inhibés par les basses températures.

Il semble donc qu'il y ait une incompatibilité entre la psychrorésistance et la thermorésistance et nous pouvons conclure à la suite de LWOFF (4 - 79 - 80) que la diminution de la thermorésistance s'accompagne d'une diminution de la psychrosensibilité et vice et versa.

La courbe de thermosensibilité qui est caractéristique de chaque souche virale varie avec les mutations. Cela se traduit par un déplacement de toute la courbe vers la gauche (zone de basses températures) pour les mutants " froids" , ou vers la droite (zone de températures élevées) pour les mutants "chauds".

Il semble que ces observations puissent être généralisées.

GEVAUDAN (66) isole des variants thermosensibles et thermorésistants du virus coxsackie. LAB (67) étudie des mutants psychrophiles et thermophiles isolés à partir du virus sindbis. GROMAN (81) sélectionne un mutant "chaud" du phage X dont le taux de multiplication à 44°C est treize fois supérieur à celui de la souche d'origine. LEBEURIER et HIRTH (82) isolent à partir de la souche sauvage du virus de la mosaïque du tabac un variant "chaud" (souche LB) dont le rendement à 32°C

est de dix à trente fois plus élevé que celui de la souche initiale, ainsi qu'une souche thermosensible MF dont la multiplication est inhibée à 24 et 32°C (72)

L'étude comparée du pouvoir pathogène de la souche WR et de ses mutants "froids" et "chauds" est particulièrement intéressante. Ainsi que nous l'avons vu, le mutant "froid" a perdu une grande partie de sa virulence, alors que la souche "chaude" a acquis au contraire une hypervirulence considérable. Cette augmentation de virulence est du même ordre de grandeur qu'elle soit mesurée par inoculation intracérébrale à la souris ou par inoculation intradermique ou intratrachéale au lapin. Ces résultats montrent que le virus vaccinal se comporte à l'égard de la température comme le poliovirus (2 - 83). En étudiant les courbes de thermosensibilité des différentes souches de poliovirus, LWOFF constate en effet que ce sont les souches les plus virulentes qui sont les plus thermorésistantes, c'est-à-dire qui possèdent le "rt" le plus élevé (40,2°C pour la souche Mahoney) alors que les souches les plus atténuées sont sensibles aux températures élevées et possèdent un "rt" relativement bas (38,5°C pour le vaccin de Sabin).

Cette corrélation entre thermorésistance et virulence avait été signalée en premier par DUBES et CHAPIN (84), puis par DUBES et WENNER (85). En effet, ces auteurs obtiennent, par passages à basses températures sur cellules de reins de singe, des mutants "froids" à partir de la souche Mabie du poliovirus. Ces mutants se développent faiblement à 30°C, mais sont inhibés à 37°C et se révèlent dénués de pouvoir pathogène pour le singe.

Inversement, par une série de passages à températures croissantes s'échelonnant entre 38 et 41°C, A. et M. LWOFF (3) obtiennent des mutants "chauds" à partir des souches BEC, SABIN et KOPROWSKI. Ces mutants en même temps qu'ils présentent un "rt" plus élevé, sont devenus hypervirulents pour le singe par injection intracérébrale : 4 UFP de mutant "chaud" produisent des paralysies, alors que 1.10⁶ UFP de mutant "froid" n'ont aucun effet sur des singes inoculés par voie intracérébrale (SABIN et LWOFF - 86).

Par la suite, A. LWOFF, P. TOURNIER, M. LWOFF et CATHALA (87) ont étudié la neurovirulence de différentes souches de virus poliomyélitique et ont précisé le rôle existant entre thermorésistance et neurovirulence.

La corrélation entre thermorésistance du développement et virulence a

été démontrée pour d'autres virus. PEROL-VAUCHEZ, TOURNIER et LWOFF (88) obtiennent un mutant "froid" du virus de l'encéphalomyélocardite dont la virulence est notablement atténuée.

INOUE et KATO (89) isolent un variant thermorésistant du virus de l'encéphalite japonaise B caractérisé par sa capacité de se multiplier à 42°C et par son hypervirulence pour la souris par voie intracérébrale.

BROWN (90) , par passages répétés à 22°C, sélectionne un mutant "froid" complètement avirulent du virus de l'encéphalite équine de l'est.

BOUDREAULT et PAVILANIS (75) sélectionnent des souches "chaude" et "froide" du virus grippal à 41°C et à 29°C. La souche "chaude" est de 100 à 1 000 fois plus virulente pour la souris que la souche "froide".

PRUNET (91), ASSO et collaborateurs (92) montrent que le virus aphteux peut se développer "in vitro" à basse température (25°C) et que les souches ainsi modifiées perdent leur pouvoir pathogène pour le boeuf.

GEVAUDAN (66) isole une souche "chaude" du virus coxsackie dont la virulence est fortement accrue pour le souriceau nouveau-né.

M. LAB (67) sélectionne un mutant "chaud" hypervirulent pour la souris à partir du virus sindbis.

Toutes ces observations aboutissent aux mêmes conclusions : les souches sélectionnées à températures élevées sont devenues très virulentes pour les animaux de laboratoire ; au contraire les mutant "froids" isolés par passage à basses températures ont perdu leur virulence.

En se basant sur les conclusions de ces travaux ainsi que sur les résultats d'expériences plus anciennes qui ont démontré le rôle bénéfique de l'hyperthermie dans certaines infections virales, A. et M. LWOFF (93) ont émis l'hypothèse que la fièvre joue un rôle important dans l'évolution de l'infection à virus en limitant le développement des virions.

Dès 1921, JOHNSON (94) a montré que le virus de la mosaïque du tabac provoque l'apparition de lésions caractéristiques dans des feuilles de tabac lorsque la température ambiante se situe entre 20 et 25°C ; au delà de 30°C le nombre des lésions diminue et à 36°C on n'en observe plus.

Des constatations analogues ont été faites par le même auteur pour le virus X de la pomme de terre (95) et par KUNKEL (96) pour une infection des pêcheurs le "peach Yellow".

KASSANIS (97 - 98 - 99), par la suite, a montré que la température inhibe le développement d'un grand nombre de virus végétaux, ce qui a conduit à l'utilisation de la thermothérapie des maladies virales chez les plantes.

Dans le cadre des infections à virus des animaux des résultats intéressants sont obtenus par WOLF (100) en 1935 qui arrive à empêcher une infection poliomyélitique chez le singe par un traitement hyperthermique précoce.

LILLIE et collaborateurs (101) aboutissent à des résultats analogues avec le virus de l'encéphalite de St. Louis chez la souris. Ils observent qu'une fièvre induite artificiellement diminue l'intensité de la maladie ; si les animaux sont exposés à des températures basses, il y a une aggravation des symptômes.

ARMSTRONG (103), par contre, note le même pourcentage de mortalité chez des souris inoculées avec le virus de l'encéphalite de St. Louis et exposées à 35, 21 et 4°C.

THOMPSON (103) montre que les virus du myxôme et du fibrome ne provoquent jamais de lésions dans les organes profonds du lapin, mais uniquement dans la peau et les testicules. Cet auteur émet l'hypothèse que c'est la température interne des animaux qui est responsable de l'inhibition du développement viral. En effet, en élevant la température ambiante, il constate chez les animaux inoculés avec le virus du fibrome que le nombre des lésions diminue. Les mêmes conclusions sont obtenues par THOMPSON et PARKER (104) avec le virus du myxôme.

ARMSTRONG (105) remarque que des souris inoculées avec le virus herpétique et maintenues à la température du laboratoire succombent, alors que l'infection est évitée chez des animaux exposés à 37°C.

SIGURDSSON (64) montre que la mortalité des embryons de poulet inoculés avec le virus de la stomatite vésiculeuse et exposés à 35°C est de 100 pour 100, alors qu'elle n'est plus que de 50 pour 100 quand les animaux sont exposés à 39 - 40°C.

En étudiant l'influence de la température ambiante sur le développement du virus grippal chez la souris, SULKIN (106) et METCALF (107) découvrent que les lésions pulmonaires des animaux exposés à 32°C sont moins sévères que celles des animaux maintenus à 15°C.

WALKER et BORING (108) signalent que l'exposition au froid favorise l'évolution d'une infection causée par le virus coxsackie chez la souris adulte.

MARSHALL (109) s'intéresse à l'influence de la température ambiante sur la mortalité des lapins inoculés avec le virus du myxôme et montre

que la mortalité est beaucoup plus importante chez des animaux qui ont été exposés à basse température.

Des travaux identiques ont été entrepris par LWOFF, TOURNIER et CARTEAUD (110) sur le virus de la poliomyélite chez la souris, et par PEROL-VAUCHEZ, TOURNIER et LWOFF (88) sur le virus de l'encéphalomyélocardite chez la souris. Les résultats obtenus par ces auteurs sont en parfaite concordance avec ceux exposés plus haut.

L'hypothermie provoquée aggravant la plupart des infections virales, alors que l'hyperthermie expérimentale permet le plus souvent de guérir les animaux infectés, il est logique de supposer que la fièvre qui accompagne certaines infections à virus joue un rôle dans la défense de l'organisme. C'est ce que nous avons essayé de démontrer au cours de recherches portant sur la pneumonie vaccinale du lapin (111 - 112).

Les animaux qui présentent une réaction fébrile intense survivent alors que ceux dont la fièvre a été coupée par l'administration répétée d'amidopyrine meurent pour la plupart. De même, le titre en virions dans les poumons des lapins hyperthermiques est en moyenne deux-cent-cinquante fois moins élevé que celui trouvé dans les poumons des lapins apyrétiques.

Une preuve supplémentaire de la relation existant entre l'hyperthermie, l'inhibition du développement des virions et la survie des animaux est fournie par les travaux de KIRN et collaborateurs (113) qui ont montré que la protection conférée par l'hyperthermie expérimentale est d'autant plus importante chez la souris inoculée par voie intracérébrale avec le virus vaccinal que le "rt" de la souche est plus bas.

Ainsi la relation entre le pouvoir pathogène "in vivo" et la thermosensibilité du développement viral "in vitro" devient claire : la multiplication des mutants "froids" de thermosensibilité augmentée est rapidement inhibée si l'animal fait de la fièvre. Au contraire, les mutants "chauds", moins sensibles à l'action des températures supra-optimales, peuvent se développer suffisamment pour provoquer des lésions organiques et amener l'apparition de symptômes cliniques.

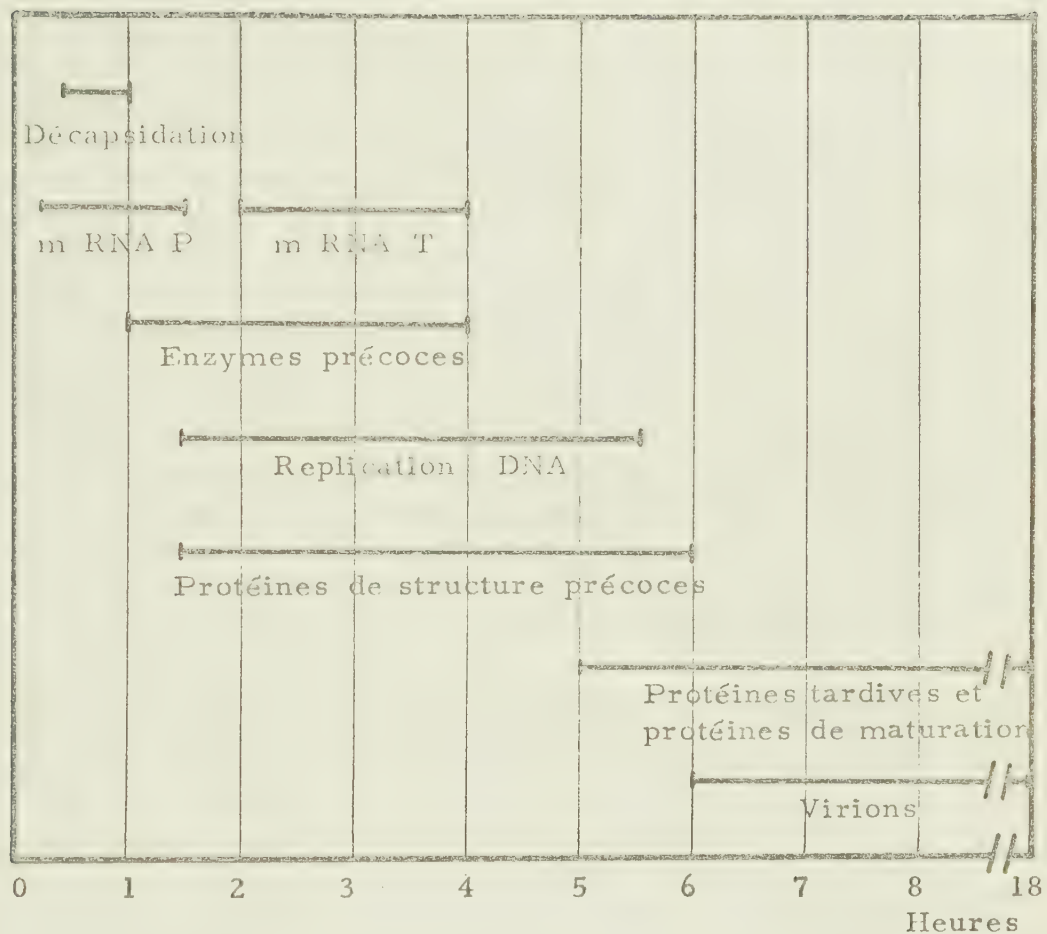
Reste à expliquer l'augmentation du pouvoir pathogène des mutants "chauds" et la diminution de la virulence des mutants "froids" en l'absence de réaction fébrile ce qui est le cas pour la plupart des infections virales de la souris. Nous rappellerons à ce propos les observations que nous avons faites avec le virus de la vaccine et qui ont été confirmées

par M. LAB (67) avec le virus Sindbis. La vitesse de développement des mutants "chauds" est plus grande quelle que soit la température ; les mutants "froids" au contraire, même à température supra-optimale, se développent moins rapidement et leur rendement est en général moins élevé. Cela permet dans une certaine mesure de rendre compte des différences de virulence observées.

x
x x

Pour explorer la thermosensibilité du développement du virus vaccinal dans les conditions expérimentales utilisées, il convenait dans un premier temps de déterminer la durée respective de chacune des phases de la multiplication virale. On sait que dès la pénétration dans la cellule, le virus vaccinal perd son enveloppe puis est décapsidé. La décapsidation qui est sous la dépendance du génome viral (114 - 115) nécessite la synthèse de protéines (27 - 116). KATES et MAC AUSLAN (117), MUNYON et collaborateurs (118) ont montré que les particules purifiées de virus vaccinal contiennent une RNA polymérase ; celle-ci de toute évidence code pour la protéine qui intervient dans la décapsidation. Une fois que le DNA viral est libéré, il code pour les enzymes précoces et commence sa replication. Certaines protéines de structure sont immédiatement synthétisées (119). Tous ces événements ont lieu durant une phase appelée phase primaire ou phase d'éclipse. La synthèse des protéines de structure tardives débute durant la phase secondaire trente minutes avant l'apparition des premiers virions néoformés (120). Les différentes étapes du cycle de développement du virus vaccinal peuvent être schématisées ainsi, (voir schéma - page 71).

L'adjonction d'inhibiteurs de la replication du DNA à des moments variables de la phase primaire suivie par un titrage des virions à la fin du cycle constitue une méthode commode pour étudier la durée de la phase primaire. La fluorodésoxyuridine empêche la conversion de l'acide désoxyuridilique en acide thymidilique ; utilisée à 10^{-5} M elle ne présente aucune toxicité pour la cellule et n'interfère pas avec la synthèse des protéines du virus. Si elle est dégradée



elle peut cependant être incorporée dans le mRNA viral sous forme de fluorouracile (SALZMAN et collaborateurs - 121). Nous avons vérifié la reproductibilité de nos résultats en ajoutant dans certaines expériences de l'uridine à 10^{-4} M dans le milieu de culture.

Dans notre système expérimental, la durée de la phase primaire déterminée par cette méthode est d'environ six heures.

En procédant à des transferts à température supra-optimale ou à des séjours de durée variable à 41°C à différents moments du cycle de développement et en suivant la cinétique de formation des virions on peut explorer la thermosensibilité des deux phases du cycle de multiplication. Nos résultats montrent qu'on peut distinguer deux périodes thermosensibles : une première correspondant à la deuxième moitié de la phase primaire et une seconde occupant toute la phase secondaire.

Un séjour de six heures à 41°C suivi par un transfert à 36°C en présence de FUDR ne s'accompagne pas d'une production de virions. Cela démontre qu'il existe un évènement thermosensible qui se situe avant ou pendant la replication du DNA viral. Le fait que les deux à trois premières heures du développement ne sont pas influencées par les températures supra-optimales suggère que la décapsidation n'est pas affectée. Dans la seconde partie de ce travail où nous exposons nos recherches portant plus particulièrement sur le premier évènement thermosensible nous développerons d'autres arguments prouvant que le mécanisme de la décapsidation n'est pas thermosensible. Notons cependant dès à présent que sur un autre système cellulaire, les cellules rénales de fœtus de veau, Annick BINGEN (communication personnelle) a constaté que l'évolution morphologique du développement du mutant "froid" pendant les quatre premières heures du cycle est comparable à 36 et à 41°C. Elle a montré notamment que la décapsidation s'effectue normalement à 41°C comme en témoignent de nombreuses images de nucléocapsides rompues.

Chaque fois qu'on effectue un transfert à 41°C au cours de la phase secondaire, le développement viral est stoppé. Cela démontre que les températures élevées interviennent également sur un ou plusieurs évènements qui se situent après la replication du DNA. En utilisant la technique de l'immunofluorescence nous avons constaté que la synthèse des antigènes du mutant "froid" du virus vaccinal n'est pas bloquée sur cellules rénales de fœtus de veau. Toutefois, la formation des antigènes semble perturbée : des modifications interviennent sur le temps d'apparition des inclusions et sur les aspects de l'immunofluorescence (122).

Avec l'adénovirus 5, SAMAILLE et WAROCQUIER (65) ont obtenu des résultats analogues aux nôtres. La première moitié de la phase primaire, c'est-à-dire les huit premières heures du cycle de développement de l'adénovirus, est insensible à l'action des températures élevées ; celles-ci ne diminuent le rendement de façon appréciable que dans la seconde moitié de cette période (entre la neuvième et la dix-huitième heure). Le transfert de 37 à 40,8°C à n'importe quel moment de la phase secondaire est suivi d'une période de deux heures au cours de laquelle la production virale ralentit puis est stoppée complètement. Ces auteurs pensent que les températures élevées agissent au stade de la synthèse des protéines de structure en affectant le fonctionnement des ribosomes (123).

Il en est tout à fait autrement pour le poliovirus (3). Si des cellules KB infectées avec une souche de poliovirus de "rt" 38,5°C sont maintenues pendant la phase de latence (trois heures) à 40°C puis transférées à 36°C les virions se développent normalement. D'autre part, si les cellules infectées sont transférées à 40°C durant la phase secondaire la production des particules infectées s'arrête trente minutes après le transfert. LWOFF en conclut que les températures supra-optimales n'ont aucune action sur la phase primaire ni sur la morphogénèse, mais bloquent un évènement de la phase secondaire.

Par la suite, LWOFF (53) a montré qu'il existe un évènement critique thermosensible très bref pour le poliovirus et que cet évènement se situe entre la fin de la phase de latence et le début de la phase secondaire. En effet, un mutant "froid" dont le développement est complètement inhibé à 40°C se multiplie normalement à cette température à condition qu'il ait été "refroidi" durant cinq minutes à 36°C entre une heure trente et deux heures dix après le début du cycle (LWOFF A., ROIZMANN et M. LWOFF - 52). LWOFF (53) suggère que l'évènement thermosensible correspond à un défaut de polymérisation de la RNA polymérase à partir des formes monomères préexistantes.

En ce qui concerne les virus végétaux, LEBEURIER (72) a montré que les températures supra-optimales agissent sur certains évènements du cycle du virus de la mosaïque du tabac, évènements qui se situeraient probablement durant la phase de latence, au moment de la replication du RNA viral.

Le transfert à température supra-optimale à différents moments du cycle, avec ou sans adjonction d'inhibiteurs, suivi par le titrage des virions ne rend compte que de la thermosensibilité du développement des particules infectieuses. Cette technique ne permet pas de savoir si des formes incomplètes ou anormales sont produites à température élevée. C'est la raison qui nous a incité à entreprendre une étude en microscopie électronique du développement du mutant "froid" à température optimale et supra-optimale.

L'étude en microscopie électronique du développement des pox virus en cultures de tissus à température optimale a fait l'objet de nombreux travaux (124 - 125 - 126 - 127 - 128 - 129 - 130 - 131 - 132 - 133 - 134).

Nos résultats montrent que les différentes étapes morphologiques de la synthèse du mutant "froid" de la souche VaMe à température optimale sont superposables à celles décrites pour d'autres souches de virus vaccinal. Par contre à 41°C, la morphogénèse des virions est complètement inhibée et les très rares viroplasmes qui apparaissent tardivement dans quelques cellules sont les seuls signes de l'infection ; ceux-ci sont généralement de taille inférieure à ceux observés à température optimale et ne contiennent que rarement des formes virales immatures. Nous n'avons jamais observé ni la présence de particules anormales, ni l'accumulation de structures caractéristiques d'un stade quelconque de la morphogénèse virale. Cela démontre que la synthèse des protéines de la capside est fortement perturbée à température élevée.

D'autres auteurs ont étudié l'influence des températures supra-optimales sur la synthèse des protéines capsidales.

SAMAILLE et collaborateurs (65) montrent dans des cellules KB infectées par l'adénovirus 5 et maintenues à 40,8°C l'existence de structures anormales qui se présentent comme des condensations de DNA viral dépourvu de capsides.

HUXSOLL et collaborateurs (135) ont sélectionné un mutant de pox-virus qui donne lieu à la synthèse de particules virales immatures dans des cellules MKTC incubées à 40°C.

LEBEURIER et HIRTH (136 - 73 - 74) ont montré que dans le cas de l'inhibition du développement du VMT par la température, il y avait une accumulation d'unités de structure protéique.

La présence d'amas ribosomiques au sein des viroplasmes a été notée par DALES (126), par KAJIOKA et collaborateurs (130) et récemment par STARR et collaborateurs (137).

Or d'après JOKLIK et BECKER (138) la formation des polysomes et par voie de conséquence la synthèse de protéines virales n'a pas lieu à l'intérieur des viroplasmes mais dans le cytoplasme environnant. Comment peut-on alors interpréter la présence des amas ribosomiques dans les viroplasmes ? JOKLIK (27) en donne l'explication suivante. Le messenger viral ne se fixerait pas directement au ribosome complet, mais s'attacherait au préalable à une sous unité libre 40S qui se combinerait ensuite à la sous-unité 60S du ribosome. On peut penser que les grains ribosomiques que nous observons au sein des viroplasmes représentent des sous-unités 40S sur lesquelles se fixe le messenger viral. Les particules migreraient alors à l'extérieur et se combineraient aux sous-unités 60S pour former les polyribosomes qui entourent

le viroplasma. A 41°C on n'observe que très rarement des amas ribosomiques et lorsqu'on effectue des transferts de 36 à 41°C, les viroplasmes ne sont plus circonscrits par des polysomes. Cela semble indiquer qu'il existe une perturbation de la synthèse des protéines à température supra-optimale.

x
x x

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'INHIBITION DE LA REPLICATION DU DNA D'UN MUTANT

"FROID" A TEMPERATURE SUPRA-OPTIMALE

M A T E R I E L E T T E C H N I Q U E S

I. SOUCHES CELLULAIRES.

Dans cette partie de notre travail nous avons utilisé les souches cellulaires KB et TK⁻ dont nous avons déjà indiqué les techniques d'entretien ainsi que la composition des milieux nécessaires à leur repiquage.

II. VIRUS.

La souche de virus utilisée est le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal.

III. PRODUITS CHIMIQUES.

La 5-fluorodésoxyuridine (FUDR) fournie par les laboratoires Hoffmann La Roche ° ou Calbiochem °° est utilisée à la concentration finale de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

La p-fluorophénylalanine (FPA) provient des laboratoires Fluka °°° ; on l'utilise à la concentration finale de 1,2 mg/ml.

La puromycine est fournie par Sigma °°°° ou Nutritional Biochemicals Corporation et est utilisée à la concentration finale de 15 γ /ml.

° HOFFMANN LA ROCHE - 10, rue Crillon - 75 PARIS IVème.

°° CALBIOCHEM A.G. - 6000 LUZERN - Löwengraben 14 (Suisse)

°°° FLUKA A.G. - BUCHS - S.G. (Suisse)

°°°° SIGMA CHEMICAL COMPANY - 3500 Dekalb St. - SAINT-LOUIS - Missouri (U.S.A.)

Le DNA, extrait de thymus de veau, provient des laboratoires Fluka.

Les nucléotides : deoxyguanosine-5'-triphosphate (dGTP)
deoxycytidine-5'-triphosphate (dCTP)
thymidine-5'-triphosphate (TTP)
ont été fournis par Calbiochem.

Le B B O T provient des laboratoires Ciba°.

IV. CORPS RADIOACTIFS.

- Les préparations de thymidine ^3H , dont l'activité spécifique est comprise entre 9 et 15 C/mM, proviennent du C.E.A. de Saclay. Elles portent la radioactivité sur le groupement méthyl. Pour les expériences d'autoradiographie l'activité spécifique a été ramenée à 3 C/mM. Les dilutions sont effectuées dans le milieu de Eagle pour avoir une activité finale de 3 $\mu\text{C}/\text{ml}$.

Dans les expériences d'incorporation l'activité finale est de 0,03 $\mu\text{C}/\text{ml}$ quand on utilise des cellules KB et de 0,12 $\mu\text{C}/\text{ml}$ pour les cellules TK $^-$.

- Les solutions de thymidine 2- ^{14}C dont l'activité spécifique est de 37,8 mC/mM sont fournies par le C.E.A. de Saclay. On utilise une activité finale de 0,2 $\mu\text{C}/\text{ml}$.

- L'adénine 2- ^3H d'activité spécifique 10 C/mM et la thymine 6- ^3H d'activité spécifique 25,8 C/mM proviennent du C.E.A. de Saclay.

- La deoxyadénosine- 5'- triphosphate 8- ^{14}C (dATP ^{14}C) est fournie par Schwartz Bioresearch °°. Son activité spécifique est de 55 mC/mM.

° CIBA - 4000 - BALE 7 (Suisse)

°° SCHWARTZ BIORESEARCH, INC. - ORANGEBURG - New-York (U.S.A.)

V. DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE EN AUTORADIOGRAPHIE.

A) Ensemencement des tubes à lamelles.

Des cellules KB, qui ont été repiquées sur tubes à lamelles (12 x 31 mm) à raison de 6×10^5 cellules par tube, sont lavées au PBS et infectées avec une suspension virale titrant $1,5 \times 10^7$ UFP sous un volume de 0,3 ml.

L'adsorption a lieu à la température du laboratoire durant 40 minutes, puis on lave 3 fois au tampon phosphate de façon à éliminer le virus non adsorbé. On ajoute 1,5 ml de milieu radioactif par tube et on incube au bain-marie, soit à 36°C, soit à 41°C.

B) Technique de l'autoradiographie.

Les cellules sont lavées dans du tampon phosphate à + 4°C, contenant de la thymidine froide à une concentration 2 000 fois plus élevée que celle du milieu de culture (139), puis fixées par le méthanol pendant 20 minutes (140). Les lamelles sont ensuite séchées à l'air et cimentées sur lame à l'aide de DPX (E. Gurr - Londres - 139). Les lames sont alors prêtes pour l'autoradiographie.

Après un passage dégressif dans les alcools, les préparations sont lavées à l'eau distillée à + 43°C. Les lames portant les lamelles de culture sont plongées dans l'émulsion photographique (émulsion Ilford K₅ sous forme de gel diluée au 1/2 avec de l'eau bidistillée à la température de + 43°C) et retirées immédiatement. L'émulsion adhérent au dos de chaque lame est enlevée au papier Joseph (141 - 142). Les lames sont ensuite placées pendant deux heures dans un dessiccateur en présence de drierite et conservées à + 4°C dans des boîtes à l'abri de la lumière pendant 14 jours.

Le développement est effectué à la température de + 15°C dans le révélateur de Dilworth (143 - diaminophenol Johnson, Londres) pendant 4 minutes ; puis les lames sont plongées dans un bain-marie d'acide acétique pendant 3 minutes (125 ml d'acide acétique à 28 pour 100 pour 1 litre d'eau distillée) et fixées pendant 25 minutes dans le fixateur radio AL₄ Kodak, lavées à l'eau ordinaire en chambre noire pendant 1 heure et à la lumière pendant environ 4 heures. Les lamelles sont ensuite colorées par le Giemsa.

C) Matériel microscopique et photographique.

Nous utilisons un photomicroscope Zeiss muni d'un objectif à immersion Apo 40/100 oel m J.

Les photographies sont prises avec un film Kodak Plus - X Pan Film (PX 135-20).

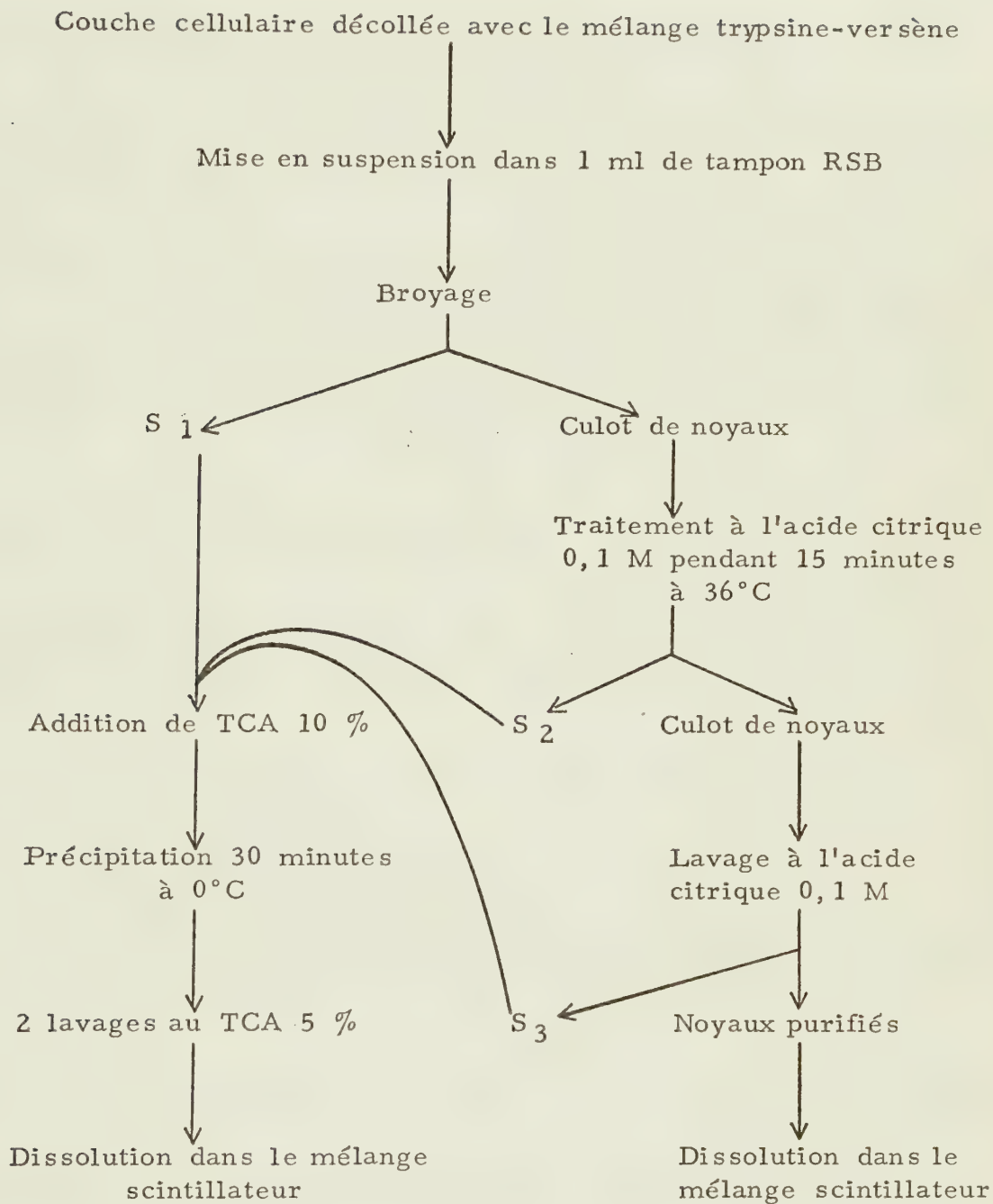
VI. DEROULEMENT D'UNE EXPERIENCE D'INCORPORATION DE THYMIDINE RADIOACTIVE.

A) Ensemencement des tubes de Leighton.

Des cellules KB âgées de 48 heures, cultivées sur tubes de Leighton, sont infectées à raison de 10 UFP/cellule sous un volume de 0,4 ml. Les tubes, placés à 36°C, sont agités pendant 1 heure pour augmenter l'efficacité de l'adsorption. Les cellules sont alors lavées à deux reprises avec du PBS pour éliminer les virions non adsorbés. On ajoute 2 ml de milieu (Eagle + 5 pour 100 de sérum de veau) contenant le précurseur radioactif. Les tubes sont incubés dans des bains-marie soit à 36, soit à 41°C.

B) Détermination de l'incorporation de la thymidine marquée dans les fractions cytoplasmique et nucléaire des cellules.

Les couches cellulaires de 4 tubes de Leighton sont décollées à l'aide du mélange trypsine-verséne et la suspension obtenue est centrifugée à 300 tours/minute pendant 3 minutes. Le culot est lavé deux fois avec le tampon PBS, puis mis en suspension dans 1 ml de tampon hypotonique RSB : Tris 10^{-2} M pH 7,4 ; KCl 10^{-2} M ; Cl_2 Mg $1,5 \cdot 10^{-3}$ M (144). Après 20 minutes pendant lesquelles les cellules sont maintenues à 0°C, on les broie dans un homogénéiseur de Dounce. Nous avons contrôlé les effets du broyage par des examens au microscope à contraste de phase : on observe qu'après 5 coups de piston, les membranes cellulaires sont rompues, alors que les noyaux sont intacts.



Le broyat est centrifugé à 2 000 tours/minute pendant 5 minutes dans une centrifugeuse Sorvall RC 2-B.

Le surnageant S_1 est prélevé ; le culot contenant les noyaux, les débris de membranes et une partie du réticulum cellulaire est mis en suspension dans 2 ml d'acide citrique 0,1 M selon les indications données par DOUNCE (145) et HANAFUSA (146).

La suspension maintenue au bain-marie à 36°C pendant 15 minutes est ensuite centrifugée à 2 000 tours/minute pendant 5 minutes et on recueille le surnageant S_2 qui est ajouté à S_1 . Le culot contenant les noyaux débarrassés des contaminations cytoplasmiques est lavé avec 1 ml d'acide citrique 0,1 M et centrifugé dans les mêmes conditions que ci-dessus. Le surnageant S_3 de cette troisième centrifugation est ajouté au mélange $S_1 - S_2$.

Les noyaux sont alors mis en suspension dans le mélange scintillateur suivant :

- toluène	600 ml
- ethermonométhylque de l'éthylène-glycol	400 ml
- naphtalène	80 g
- BBOT	4 g

La radioactivité est mesurée dans un compteur à scintillation Beckman, type CPM 200. L'activité est exprimée en coups par minute (CPM). Au mélange $S_1 - S_2 - S_3$ on ajoute de l'acide trichloracétique (TCA) à 10 pour 100 de manière à obtenir une concentration finale de 5 pour 100. Après une demi-heure de précipitation à 0°C, le mélange est centrifugé ; le précipité obtenu est alors lavé deux fois au TCA 5 pour 100 avant d'être dissous dans le mélange scintillateur.

La succession des différentes étapes décrites est représentée dans le schéma de la page 83.

VII. TECHNIQUES UTILISEES POUR L'ETUDE DES ENZYMES.

A) Thymidine kinase.

1) Préparation de l'extrait enzymatique.

Des cellules KB âgées de 48 heures, cultivées en boîtes de Roux, sont infectées avec 5 UFP/cellule du mutant "froid" du virus vaccinal sous un volume de 5 ml. Après 1 heure d'adsorption à 36°C, les cellules sont lavées au PBS et recouvertes avec 50 ml de milieu de Eagle additionné de 10 pour 100 de sérum de veau. A différents moments après l'infection, les cellules sont détachées de la paroi à l'aide de billes de verre, centrifugées à 300 tours/minute et le culot de 4×10^7 cellules, après avoir été lavé deux fois au PBS, est mis en suspension dans 2 ml de tampon pendant 20 minutes (Tris 10^{-2} M, pH 7,9 ; KCl 0,1 M ; mercaptoéthanol $3 \cdot 10^{-3}$ M) et on broie les cellules dans un homogénéiseur de Dounce. Le broyat est centrifugé à 8.000 tours/minute pendant 15 minutes et la fraction cytoplasmique surnageante est utilisée comme préparation enzymatique.

2) Détermination de l'activité enzymatique.

L'activité de la thymidine kinase a été déterminée par la méthode de FURLONG (147).

On mesure la quantité de thymidine ^{14}C phosphorylée en TMP, TDP et TTP dans un milieu réactionnel contenant dans un volume de 0,2 ml :

1,35 μM d'ATP
1,6 μM de Cl_2Mg
10 μM de Tris pH = 7,9
0,2 μM de mercaptoéthanol
110 μM de thymidine ^{14}C (activité spécifique 0,37 mC/mM)
600 et 900 γ de la préparation enzymatique sous un volume de 100 et 150 μl .

La réaction est effectuée à 37°C pendant 10 minutes ; elle est stoppée par addition de 50 μl d'éthyldiaminotétra-acétate de sodium ($5 \cdot 10^{-3}\text{M}$) à 0°C.

On prépare des carrés de papier cellulose DEAE (Whatman DE 81) de 2 cm de côté. Pour chaque échantillon on utilise deux carrés sur lesquels on dépose 0,1 ml de milieu réactionnel ; on obtient ainsi deux séries de carrés. Après séchage à la température du laboratoire, chaque échantillon d'une série est dissous immédiatement dans un flacon contenant 12 ml de scintillateur à base de BBOT. Les échantillons de l'autre série sont lavés 4 à 5 fois dans de l'alcool à 95 pour 100

afin d'éliminer toute trace de thymidine ^{14}C , puis séchés et dissous dans le scintillateur. La radioactivité est mesurée dans un compteur Beckman type CPM 200.

On obtient le pourcentage de thymidine ^{14}C phosphorylée dans chaque échantillon par le calcul suivant :

$$\frac{\text{CPM des échantillons lavés}}{\text{CPM des échantillons non lavés}} \times 100$$

Nos résultats sont exprimés par le pourcentage de thymidine phosphorylée par mg de protéines.

3) Détermination de la teneur en protéines.

La quantité de protéines des échantillons d'enzymes est déterminée par la méthode de WARBURG et CHRISTIAN (148). Les densités optiques sont mesurées au spectrophotomètre Zeiss, type PMQ II.

B) DNA Polymérase.

1) Préparation de l'extrait enzymatique.

La méthode utilisée est semblable à celle décrite pour préparer la thymidine kinase, avec toutefois quelques modifications. Les cellules KB sont infectées avec 20 UFP/cellule sous un volume de 20 ml ; l'adsorption s'effectue soit à 36 soit à 41°C selon la température étudiée.

Avant de broyer les cellules, le culot cellulaire est mis en suspension dans 1 ml d'eau distillée pendant 20 minutes, puis on ajoute le même volume de tampon hypotonique (Tris $1,2 \cdot 10^{-1}$ M, pH 7,4 ; Cl_2 Mg $1,2 \cdot 10^{-2}$ M).

2) Détermination de l'activité enzymatique.

Nous avons utilisé la méthode décrite par JUNGWIRTH et JOKLIK (149) que nous avons quelque peu modifiée. L'activité de la DNA polymérase est déterminée en mesurant la quantité de dATP

marqué au ^{14}C incorporée dans le précipité acido-insoluble du milieu réactionnel contenant dans un volume de 0,3 ml :

- . 15 μM de Tris pH = 7,4
- . 1,5 μM de Cl_2Mg
- . 80 μM de chacun des trois nucléotides suivants : TTP, dGTP, dCTP.
- . 1,3 μM de dATP ^{14}C (activité spécifique 100 mC/mM)
- . 25 $\%$ de DNA de thymus de veau dénaturé (on chauffe une solution de 500 $\%$ /ml à + 100°C pendant 10 minutes, puis on refroidit rapidement à - 60°C).
- . 300 et 600 $\%$ de la préparation enzymatique sous un volume de 50 et 100 μl .

La réaction est effectuée à 37°C pendant 30 minutes ; elle est stoppée par refroidissement à 0°C et par addition d'acide trichloracétique à une concentration finale de 5 pour 100.

Après 30 minutes de précipitation à 0°C, le matériel acido-insoluble est filtré sur membrane Sartorius (MF 50) et lavé deux fois au TCA 5 pour 100. Le précipité retenu sur le filtre est ensuite dissous dans 12 ml de scintillateur à base de BBOT et la radioactivité est mesurée dans un compteur Beckman type CPM 200. L'activité est exprimée en coups par minute (CPM) par mg de protéines.

C) Désoxyribonucléases.

1) Préparation du DNA radioactif:

a) Marquage des cellules KB.

Dans des flacons plasma de 2 litres on repique des cellules KB en milieu LaYe enrichi avec 5 pour 100 de sérum de veau auquel on a ajouté les corps radioactifs suivants :

- . 0,5 mC de thymine ^3H /litre
- . 0,5 mC d'adénine ^3H /litre.

Après une incubation de 3 jours à 37°C, on prélève les cellules pour en extraire le DNA.

b) Extraction du DNA des cellules KB.

Nous avons suivi la technique de MARMUR (. 150) dont nous donnons ici le principe.

Afin d'éliminer toute activité désoxyribonucléasique et afin de dénaturer les protéines, les cellules sont mises en suspension dans une solution saline d'EDTA contenant du lauryl sulfate de sodium, et on broie dans un mixer Sorvall pour lyser la totalité des cellules.

Les protéines sont séparées des acides nucléiques par un mélange constitué à volume égal de perchlorate de sodium fortement concentré (5 M) et d'une solution de chloroforme-alcool isoamylique (24V/1V).

Après centrifugation, les acides nucléiques qui se trouvent dans le surnageant sont précipités par de l'alcool éthylique à 95 pour 100 ; on recueille les acides nucléiques autour d'une baguette de verre et on dissout dans du citrate de sodium. On procède alors à des déprotéinisations successives par le mélange chloroforme-alcool isoamylique jusqu'à disparition complète des protéines . A ce moment on élimine le RNA par action de la ribonucléase et on effectue une précipitation sélective du DNA par l'isopropanol.

Le DNA obtenu est alors dissous dans de l'eau saline et est conservé à - 35°C. Par cette technique on peut obtenir, à partir de $2,5 \times 10^9$ cellules, une solution contenant 1 mg de DNA/ml dont la radioactivité est d'environ 1.10^6 CPM/ml.

2) Désoxyribonucléases basique et neutre.

a) Préparation de l'extrait enzymatique.

L'ensemencement des cellules et la préparation de l'extrait enzymatique s'effectuent selon le mode opératoire décrit pour l'étude de la DNA polymérase.

b) Détermination de l'activité enzymatique.

L'activité DNasique est déterminée en mesurant la quantité de DNA marqué au tritium qui est hydrolysé dans une réaction enzymatique semblable à celle utilisée pour la DNA polymérase.

Pour l'étude de l'activité de la DNase neutre qui agit sur le DNA monocaténaire, le DNA radioactif est au préalable dénaturé par un chauffage à + 100°C pendant 10 minutes suivi d'un refroidissement brutal à - 60°C.

Le milieu réactionnel comprend :

- . 350 μ l de la solution de DNA radioactif diluée soit dans un tampon neutre (Tris $1,2 \cdot 10^{-1}$ M, pH 7,4 ; Cl_2 Mg $1,2 \cdot 10^{-2}$ M) soit dans un tampon basique (3,3. 10^{-1} M glycine, pH 8,5 ; Cl_2 Mg $2 \cdot 10^{-2}$ M) afin d'obtenir 40 $\%$ de DNA radioactif (1 000 CPM/ $\%$).
- . 20 à 200 μ l d'extrait enzymatique.
- . une quantité x μ l de tampon neutre (Tris $6 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7,4 ; Cl_2 Mg $6 \cdot 10^{-3}$ M) pour obtenir un volume final de 550 μ l.

La réaction est effectuée à 37°C durant 30 minutes ; elle est arrêtée par refroidissement à 0°C et addition de 100 μ l d'une solution d'en- traîneur de DNA (0,800 mg de DNA froid + 1,3 mg de sérum albu- mine par millilitre). On ajoute de l'acide trichloracétique à 10 pour 100 de manière à obtenir une concentration finale de 5 pour 100. Après une demi-heure de précipitation à 0°C, on centrifuge et on mesure la radioactivité du surnageant dans un compteur à scintillation.

3) Désoxyribonucléase acide.

Nous avons utilisé la technique indiquée par MAC AUSLAN et KATES (151).

a) Préparation de l'extrait enzymatique :

L'ensemencement de boîtes de Roux est effectué selon les méthodes déjà décrites.

A différents moments après l'infection, les cellules sont récoltées et des culots de 2×10^7 cellules sont mis en suspension dans 3 ml de tampon Tris-HCl (0,01 M pH = 7,4) et sont traités aux ultra-sons à une fréquence de 20 Kc/sec. et à une amplitude de 6 pendant 30 secondes (MSE ultrasonic disintegrator).

On centrifuge à 100.000 g pendant 1 heure et on mesure l'activité DNAsique de la fraction surnageante ("fraction soluble").

Le culot cellulaire est lavé au tampon Tris, puis remis en suspension dans 3 ml de ce même tampon à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce. La suspension est partagée en deux :

- . la première moitié constitue la fraction particulaire,

- . la seconde moitié est traitée par 0,5 pour 100 de désoxycholate de sodium et par les ultra-sons ("fraction particulaire traitée au désoxycholate de sodium").

L'activité enzymatique est mesurée dans les deux fractions.

b) Détermination de l'activité enzymatique.

L'activité de la DNase acide des 3 fractions extraites est déterminée en mesurant la quantité de DNA hydrolysée dans une réaction enzymatique effectuée de la manière suivante :

- . 20 μ l de la suspension enzymatique sont mélangés à 10 μ l de sulfate d'ammonium saturé à 70 pour 100 ; puis on ajoute 350 μ l de tampon acétate de sodium 0,01 M (pH = 4,8) contenant 40 $\%$ de DNA radioactif (1 000 CPM/ $\%$) et dénaturé par un chauffage préalable à + 100°C suivi d'un refroidissement brutal à - 60°C.

La réaction enzymatique a lieu à 37°C pendant 30 minutes ; elle est stoppée par refroidissement à 0°C, par addition de 100 μ l d'une solution d'entraîneur de DNA (2,5 mg DNA froid + 5 mg de sérum albumine par millilitre) et de 500 μ l de HCl 0,5 M. On centrifuge à 30.000 g pendant 5 minutes et la radioactivité du surnageant est mesurée dans un compteur à scintillateur.

L'activité enzymatique est exprimée par le pourcentage de DNA rendu acido-soluble en 30 minutes à 37°C.

x
x x

R E S U L T A T S



I. INHIBITION DE LA REPLICATION DU DNA DU MUTANT "FROID"

VAME 25°/16 A TEMPERATURE SUPRA-OPTIMALE.

Les expériences que nous venons de rapporter montrent que la seconde moitié de la phase primaire du cycle de développement du virus vaccinal est hautement sensible à l'effet des températures élevées. On sait que la replication du DNA viral s'effectue durant la phase primaire et qu'elle est achevée quand débute la phase secondaire. De ce fait, il s'avérait logique de rechercher dans quelle mesure la synthèse du DNA du mutant "froid" était inhibée par l'incubation à température supra-optimale. Nous avons donc entrepris une étude comparée de la replication du DNA viral à températures optimale et supra-optimale en utilisant plusieurs méthodes de sensibilité différente.

A) Etude autoradiographique.

Cette technique particulièrement appropriée pour l'étude de la replication du DNA des désoxyribovirus à développement cytoplasmique, outre sa très grande sensibilité, permet de localiser facilement les sites de replication du DNA viral dans la cellule.

1) A 36° C.

Dès la deuxième heure après l'infection, on voit apparaître dans le cytoplasme des cellules infectées des inclusions rondes, denses et bien individualisées dont la taille et le nombre augmentent en fonction du temps (photo 1 de la planche VI).

Dans une même cellule, le diamètre des inclusions est pratiquement le même et la synthèse du DNA semble débiter au même moment dans tous les centres de synthèse. Au contraire, d'une cellule à l'autre, l'intensité de la synthèse n'est pas identique ; à une même heure, si la plupart des cellules présentent des inclusions de grande taille, il en est d'autres où la taille des inclusions est plus petite, ce qui montre que la synthèse du DNA dans ces cellules est en retard.

D'autre part, la replication du DNA viral n'est pas incompatible avec la synthèse du DNA cellulaire ; dans certaines cellules infectées on observe également des noyaux marqués.

A partir de la sixième heure, les inclusions subissent une transformation complète : d'une part, elles s'allongent et fusionnent, d'autre part les grains d'argent qui les constituent se dispersent dans le cytoplasme (photo 2 de la planche VI). Cette dispersion qui débute avec la phase secondaire correspond à l'apparition des premiers virions néoformés et croit en fonction du temps. Il existe un parallélisme marqué entre l'élévation du titre infectieux et la dispersion du DNA viral.

2) A 41°C.

Quelque soit le temps auquel on effectue les prélèvements, aucune synthèse de DNA ne peut être mise en évidence dans les cellules infectées incubées à 41°C (photo 3 de la planche VI).

Le tableau VI indique en fonction du temps le pourcentage de cellules KB infectées et incubées à 36 et à 41°C et qui présentent des inclusions de DNA viral.

Heures des prélèvements	Températures d'incubation	
	36°C	41°C
2 heures	9 pour 100	0
5 heures	45 pour 100	0
7 heures	49 pour 100	0
9 heures	60 pour 100	0

TABLEAU VI. Pourcentage, en fonction du temps et de la température d'incubation, de cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal et présentant des inclusions cytoplasmiques de DNA viral.

B) Etude de la replication du DNA viral par incorporation de thymidine ^{14}C dans la fraction cytoplasmique des cellules infectées.

1) Cinétiques de la synthèse du DNA viral à températures optimale et supra-optimale.

L'incorporation de thymidine ^{14}C dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le virus vaccinal rend compte de façon précise de la quantité de DNA viral formée à un moment donné du cycle de développement.

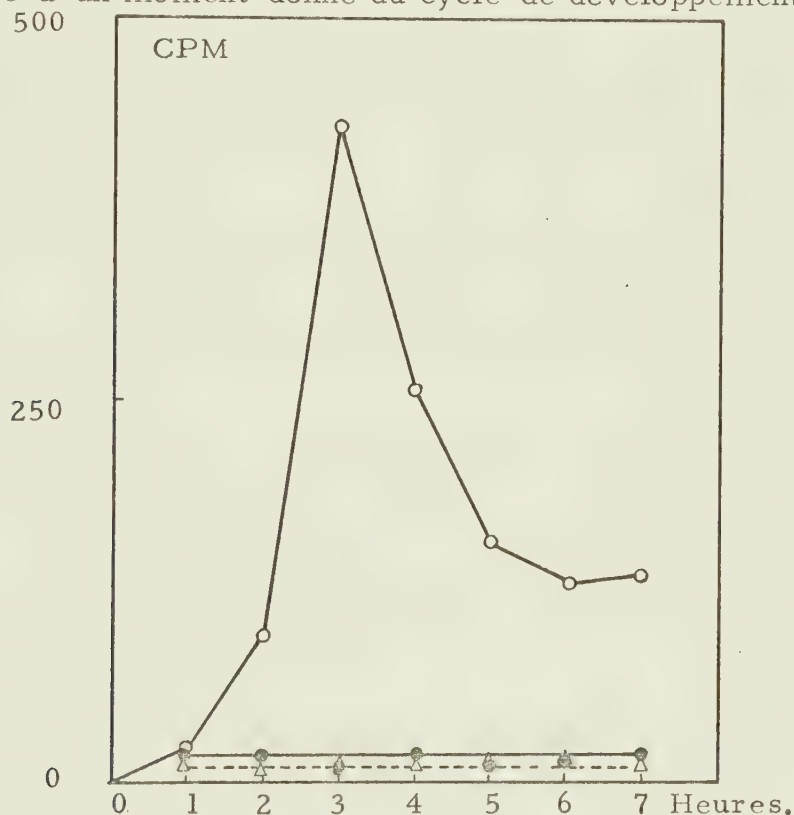


FIGURE 17. Etude cinétique de la synthèse du DNA viral par incorporations partielles de thymidine ^{14}C dans des cellules KB infectées par le mutant "froid" du virus vaccinal. La thymidine ($0,2 \mu\text{C}/\text{ml}$) est ajoutée une heure avant chaque prélèvement.

- o Cellules infectées maintenues à 36°C .
- Cellules non infectées maintenues à 36°C .
- Δ Cellules infectées et non infectées maintenues à 41°C .

En procédant à des incorporations partielles une heure avant les prélèvements, on peut établir la cinétique de la replication du DNA viral. La figure 17 montre qu'à 36°C la synthèse du DNA viral débute deux heures après l'infection, qu'elle atteint un maximum à la troisième heure et qu'elle décroît ensuite jusqu'à la septième heure.

A 41°C par contre il n'y a aucune incorporation dans la fraction cytoplasmique des cellules infectées ; la courbe se superpose à celles obtenues avec des cellules non infectées maintenues à 36 et à 41°C.

2) Transferts à 41°C à différents moments de la phase primaire.

Les résultats ci-dessus montrent que la synthèse du DNA viral est inhibée par les températures supra-optimales. On peut se demander si l'inhibition ne porte pas sur les stades initiaux de la replication. Dans ce cas la synthèse du DNA une fois commencée devrait se poursuivre à 41°C.

La figure 18 indique les quantités de DNA viral synthétisées à la septième heure après l'infection de cellules KB incubées pendant des temps variables à 36 puis transférées à 41°C.

On constate qu'à chaque passage à 41°C, la synthèse du DNA viral est inhibée.

On remarque d'autre part que la quantité de DNA synthétisée après un transfert à 41°C est inférieure à celle donnée par la courbe témoin à 36°C. Cela nous a incité à étudier de façon plus précise l'effet d'un transfert à 41°C sur le DNA viral synthétisé à température optimale.

Des cultures de cellules KB sont infectées à 36°C avec le mutant "froid" du virus vaccinal ; après des temps variables, on transfère les cellules à 41°C et on mesure l'incorporation de thymidine ³H dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique des cellules à différents moments.

La figure 19 donne les résultats d'une telle expérience. Que le transfert à 41°C ait lieu deux, trois ou quatre heures après l'infection, on observe un arrêt de la synthèse puis une dégradation du DNA viral. A la neuvième heure, la quantité de DNA mise en évidence ne représente que 27 pour 100 du DNA normalement synthétisé dans des cellules placées à 36°C pendant le même temps.

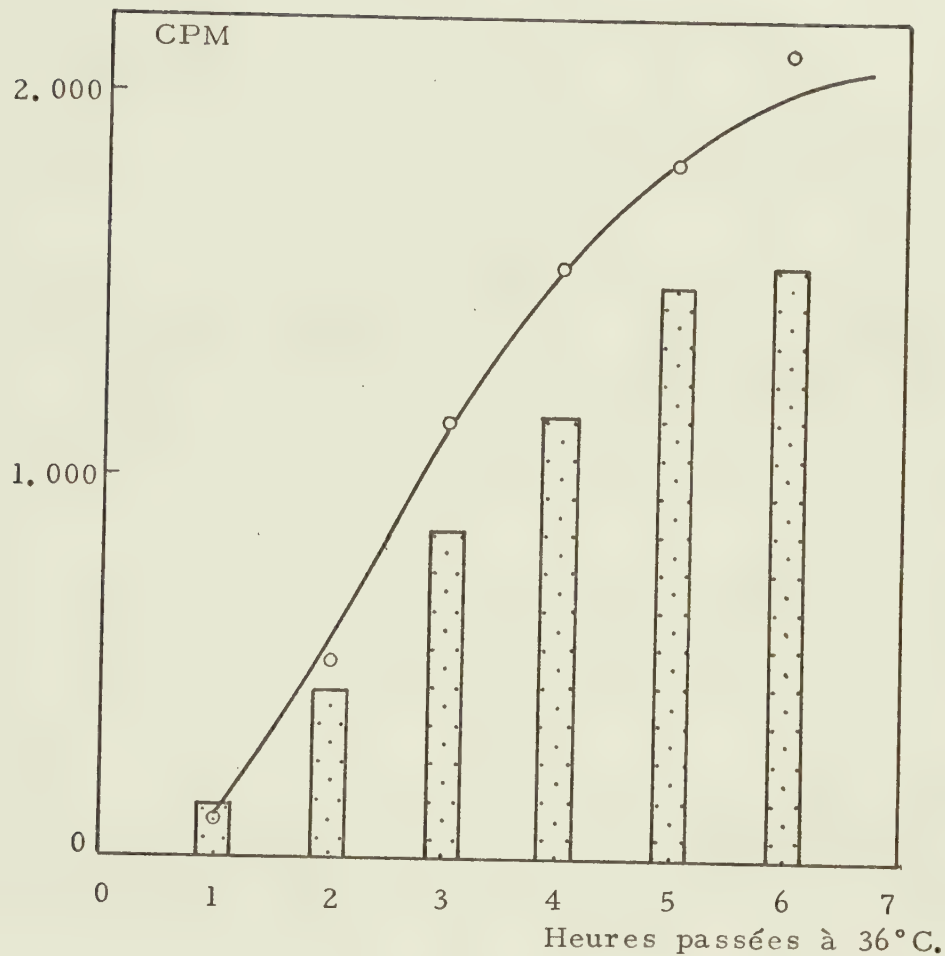


FIGURE 18. Influence des passages à 41°C à différents moments au cours de la phase primaire sur la synthèse du DNA viral dans des cellules KB infectées avec le mutant "froid" du virus vaccinal. La thymidine ^{14}C (0,2 $\mu\text{C}/\text{ml}$) est ajoutée au temps 0.

Ronds : Cinétique de la synthèse du DNA viral à 36°C.

Colonnes : Transfert de 36 à 41°C au moment indiqué et mesure de l'incorporation à la septième heure.

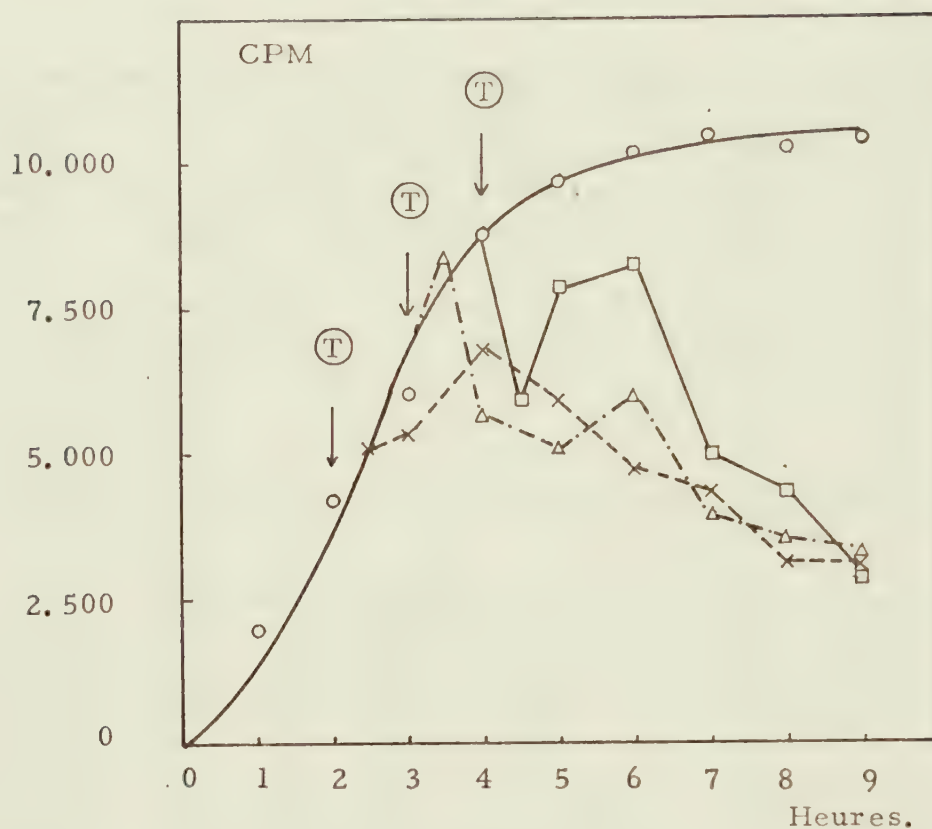


FIGURE 19. Dégradation du DNA viral à 41°C mesurée par incorporation de thymidine ^3H dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" du virus vaccinal.

- Cellules maintenues à 36°C pendant neuf heures.
- x---x Cellules maintenues à 36°C pendant deux heures puis transférées à 41°C jusqu'à la neuvième heure.
- Δ---Δ Cellules maintenues à 36°C pendant trois heures puis transférées à 41°C jusqu'à la neuvième heure.
- Cellules maintenues à 36°C pendant quatre heures puis transférées à 41°C jusqu'à la neuvième heure.
- (T) Transfert à 41°C.

La thymidine ^3H (0,03 $\mu\text{C}/\text{ml}$) a été ajoutée au temps 0.

Pour tenter de déterminer les causes de cette dégradation, nous nous sommes demandé si elle n'était pas due à une protéine d'activité nucléasique qui serait synthétisée à température supra-optimale. Si cette hypothèse s'avère exacte, en ajoutant un inhibiteur de la synthèse protéique au moment du transfert, on ne doit plus observer de dégradation.

Quatre séries de tubes sont infectées et mises à incuber à 36°C pendant deux heures. Deux séries sont alors transférées à 41°C, l'une en présence de puromycine (15 μ g /ml), l'autre sans adjonction d'inhibiteur. Les deux autres restent à 36°C après que l'on ait ajouté de la puromycine dans l'une.

Les résultats de cette expérience sont schématisés sur la figure 20. Dans les cultures maintenues à 36°C, la puromycine bloque immédiatement la synthèse du DNA viral et on n'observe aucune dégradation du DNA viral.

A 41°C, on constate que la dégradation est la même avec ou sans puromycine ; cela démontre que la dégradation du DNA viral à température supra-optimale n'est pas due à une nouvelle synthèse de protéines.

Ces expériences permettent de conclure que les températures supra-optimales d'une part bloquent la replication de DNA du mutant "froid" du virus vaccinal dans les cellules KB à n'importe quel moment de la phase primaire, d'autre part provoquent une dégradation du DNA synthétisé à 36°C.

II. ETUDE DE LA THERMOSENSIBILITE DES PROTEINES PRECOCES.

Le blocage de la replication du DNA viral à température supra-optimale étant démontré, il était logique de chercher à quel niveau intervenait cette inhibition. On sait que la synthèse d'un certain nombre de protéines est induite dans la cellule infectée dès la première heure qui suit l'infection. Parmi ces protéines "précoces", des enzymes codées par le virus participent à la replication du DNA. Nous nous sommes demandé si la thermosensibilité d'une ou de plusieurs protéines précoces ne pouvait pas être rendue responsable de l'inhibition de la replication du DNA viral à température élevée. Pour répondre à cette question, il convenait, dans un premier temps, d'étudier l'influence de

l'adjonction de différents inhibiteurs de la synthèse des protéines sur la replication du DNA viral.

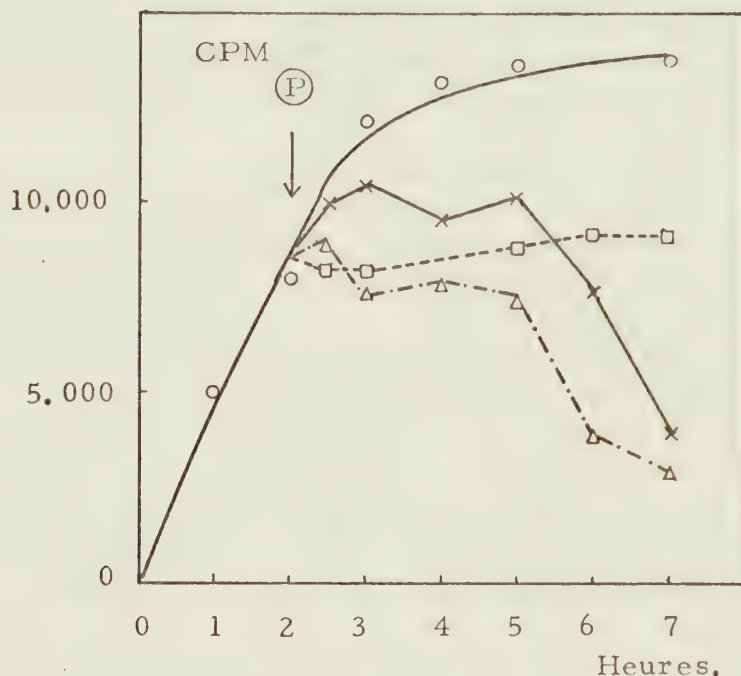


FIGURE 20. Dégradation du DNA viral à 41°C mesurée par incorporation de thymidine ^3H (0,03 $\mu\text{C}/\text{ml}$) dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" du virus vaccinal.

- Cellules maintenues à 36°C pendant sept heures.
- Cellules maintenues à 36°C pendant sept heures avec adjonction de puromycine à la deuxième heure.
- x—x Cellules maintenues à 36°C pendant deux heures puis transférées à 41°C jusqu'à la septième heure.
- △---△ Cellules maintenues à 36°C pendant deux heures puis transférées à 41°C en présence de puromycine jusqu'à la septième heure.
- (P) Addition de puromycine (15 γ/ml).

A) Inhibition de la replication du DNA viral par adjonction de puromycine ou de fluorophénylalanine.

Lorsqu'on ajoute un inhibiteur de la synthèse des protéines à différents moments de la phase primaire à des cellules infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 et incubées à 36°C la replication du DNA est bloquée immédiatement.

La figure 21 indique la quantité de DNA viral synthétisée à la sixième heure après l'infection après qu'on ait ajouté de la fluorophénylalanine à raison de 1,2 mg/ml (figure 21 A) ou de la puromycine à raison de 15 γ /ml une, deux, trois, quatre ou cinq heures après l'infection (figure 21 B). On constate qu'après chaque adjonction d'inhibiteur la synthèse du DNA viral est stoppée.

B) Nécessité d'une nouvelle synthèse de protéines dans le cas d'un transfert de 41 à 36°C.

Des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 sont maintenues à 41°C pendant les cinq premières heures du cycle. Elles sont ensuite transférées à 36°C en présence d'un milieu marqué additionné ou non d'inhibiteurs de la synthèse protéique. Après cinq heures d'incubation à température optimale on mesure l'incorporation de thymidine ^3H dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique et on dénombre les inclusions en autoradiographie.

La colonne C de la figure 22 et la photo 4 de la planche VI représentent la quantité de DNA viral synthétisée en l'absence d'inhibiteur ; cette synthèse est légèrement inférieure à celle obtenue chez un témoin qui a été incubé à 36°C pendant cinq heures (colonne A). Cela démontre qu'à température supra-optimale aucune altération irréversible n'a eu lieu. Si au moment du transfert à 36°C on ajoute un inhibiteur de la synthèse protéique, comme la fluorophénylalanine (1,2 mg/ml) ou la puromycine (15 γ /ml), la synthèse du DNA viral est négligeable (colonne D de la figure 22 et photo 5 de la planche VI). Les résultats de cette expérience démontrent que dans le cas d'un transfert de 41 à 36°C une nouvelle synthèse de protéines est nécessaire pour obtenir une replication du DNA viral.

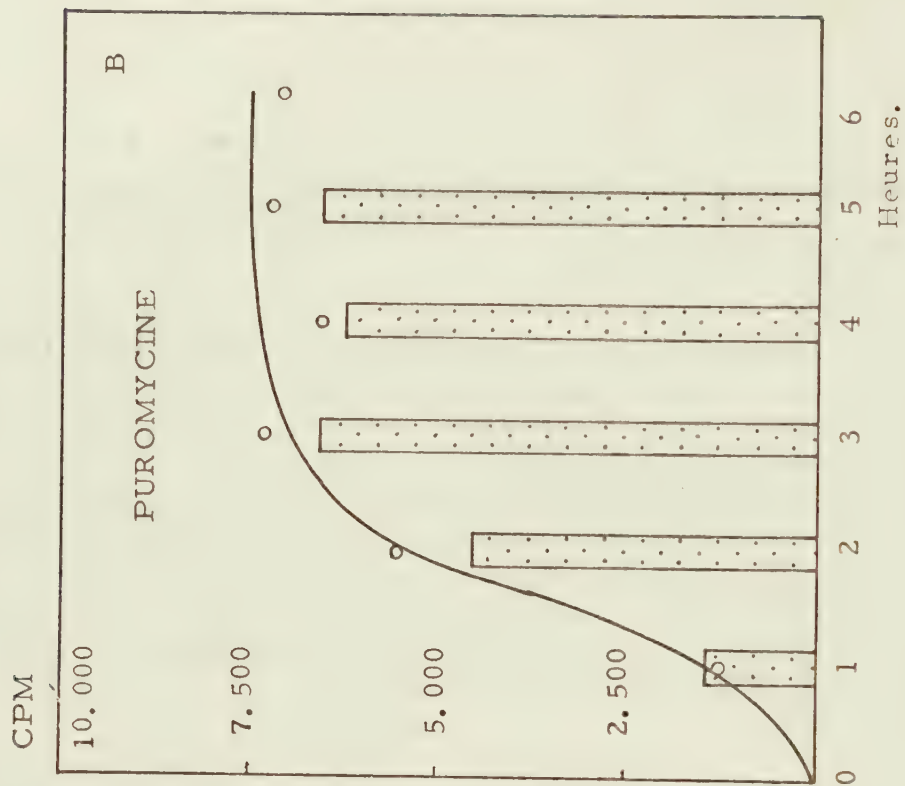
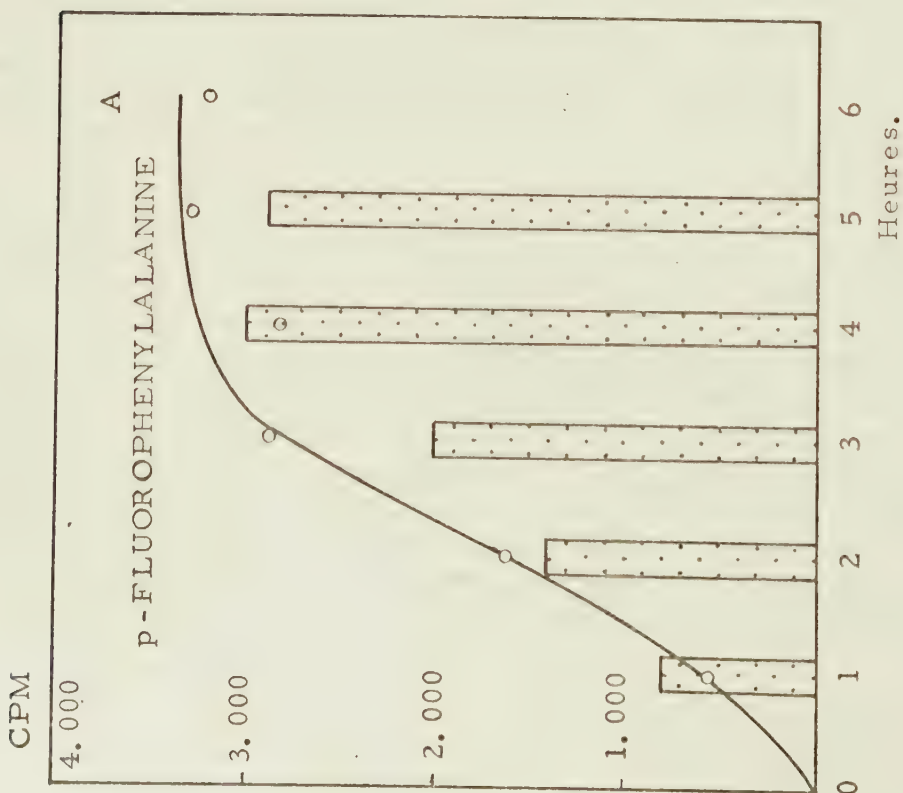


FIGURE 21 A.

Influence de l'adjonction de p-fluorophénylalanine (15 μ /ml) et de p-fluorophénylalanine (1,2 mg/ml) à différents moments de la phase primaire sur la synthèse du DNA viral à 36°C. La thymidine ^3H (0,03 $\mu\text{C}/\text{ml}$) a été ajoutée au temps 0.

FIGURE 21 B.

Cercles : Cinétique de la synthèse du DNA viral à 36°C.
Colonnes : Adjonction de l'inhibiteur à différents moments et mesure de l'incorporation à la sixième heure.

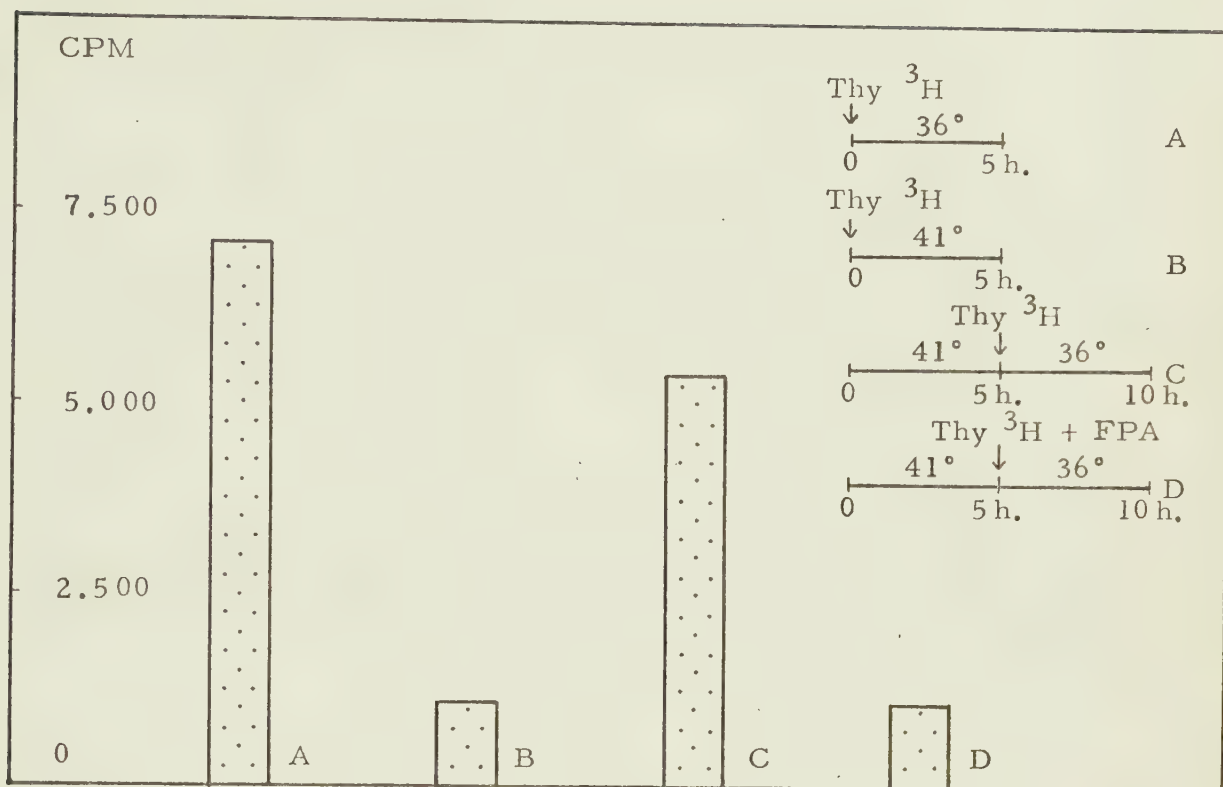


FIGURE 22. Incorporation de thymidine ^3H ($0,03 \mu\text{C}/\text{ml}$) à 36°C dans la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" de virus vaccinal et préincubées cinq heures à 41°C .
La fluorophénylalanine a été ajoutée trente minutes avant le transfert.

Avec la technique autoradiographique on obtient des résultats similaires. Des cellules infectées qui subissent des incubations de durée variable à 41°C (une, deux, trois, quatre et cinq heures) sont transférées à 36°C jusqu'à la dixième heure après l'infection. Une série reçoit de la fluorophénylalanine ($1,2 \text{ mg}/\text{ml}$) trente minutes avant le transfert à température supra-optimale ; l'autre série qui sert de témoin n'en reçoit pas. Le dénombrement des inclusions est effectué à la dixième heure. Les résultats d'une de ces expériences sont rapportés dans le tableau VII.

On voit que le séjour à température élevée ne modifie pas de façon notable la synthèse du DNA. En effet, le nombre de cellules présentant des inclusions cytoplasmiques à la dixième heure dans la série qui a séjourné à 41°C au début du cycle est comparable à celui de la série incubée à 36°C.

Au contraire, les cellules qui ont reçu du FPA au moment du transfert à 36°C ne présentent aucune inclusion.

Incubation (heures)		Pourcentage de cellules présentant des inclusions de DNA cytoplasmique	
41°C	36°C	Sans FPA	Avec FPA °
0	10	68 pour 100	0
1	9	73 pour 100	0
2	8	68,5 pour 100	0
3	7	57 pour 100	0
4	6	55 pour 100	0

TABLEAU VII. Effet d'un transfert de 41 à 36°C après adjonction ou non de FPA (1,2 mg/ml) sur le nombre de cellules présentant des inclusions de DNA cytoplasmique en autoradiographie.

° Le FPA a été ajouté immédiatement après l'adsorption.

Au cours de cette série d'expériences notre attention a été attirée par un phénomène particulier. Lorsque des cellules infectées sont maintenues à 41°C pendant cinq heures puis sont transférées à 36°C, il est indispensable pour observer une synthèse de DNA viral de laver les cellules et de renouveler le milieu avant le transfert à température supra-optimale.

En effet, si on se contente d'ajouter le précurseur radioactif dans le milieu de culture sans changer celui-ci, la synthèse du DNA viral à la dixième heure est très réduite comme le montre le tableau VIII.

	Pourcentage de cellules présentant des inclusions de DNA viral	
	Pas de changement de milieu au moment du transfert de 41 à 36°C	Changement de milieu au moment du transfert de 41 à 36°C
Exp. 1	14,5 pour 100	35,5 pour 100
Exp. 2	20,5 pour 100	35 pour 100

TABLEAU VIII. Influence du lavage de la couche cellulaire et du changement du milieu de culture sur la synthèse du DNA viral après un séjour de cinq heures à 41°C suivi d'un transfert à 36°C. Le dénombrement des inclusions a lieu à la dixième heure après l'infection.

Aucune explication satisfaisante n'a encore pu être donnée à ce phénomène.

C) Thermosensibilité des enzymes précoces.

KATES et MAC AUSLAN (152) ont montré qu'en bloquant la synthèse du DNA viral du "rabbitpox" au début de l'infection par de la fluorodésoxyuridine on provoque une accumulation des protéines précoces. Celles-ci peuvent ensuite conduire à une replication du DNA viral en l'absence de toute nouvelle synthèse protéique, si au bout de quelques heures on lève l'inhibition par de la thymidine. Il nous a semblé intéressant de vérifier cette observation avec le virus de la vaccine et d'utiliser cette technique, le cas échéant, pour explorer la thermosensibilité des protéines impliquées dans la synthèse du DNA viral.

En ajoutant de la fluorodésoxyuridine au début du cycle, puis en réversant son action à la cinquième heure par de la thymidine, on peut

observer une synthèse de DNA viral à température optimale en présence de fluorophénylalanine comme en témoigne la colonne C de la figure 23. Les enzymes précoces impliquées dans la replication du DNA du virus de la vaccine se comportent donc comme celles du virus du "rabbitpox". Si, par contre, on effectue la même expérience, mais avec un passage à 41°C à la cinquième heure, on s'aperçoit que la synthèse du DNA viral mesurée à la dixième heure est plus de quatre fois inférieure. La colonne D de la figure 23 démontre que le fonctionnement des enzymes formées à 36°C est perturbé à température supra-optimale.

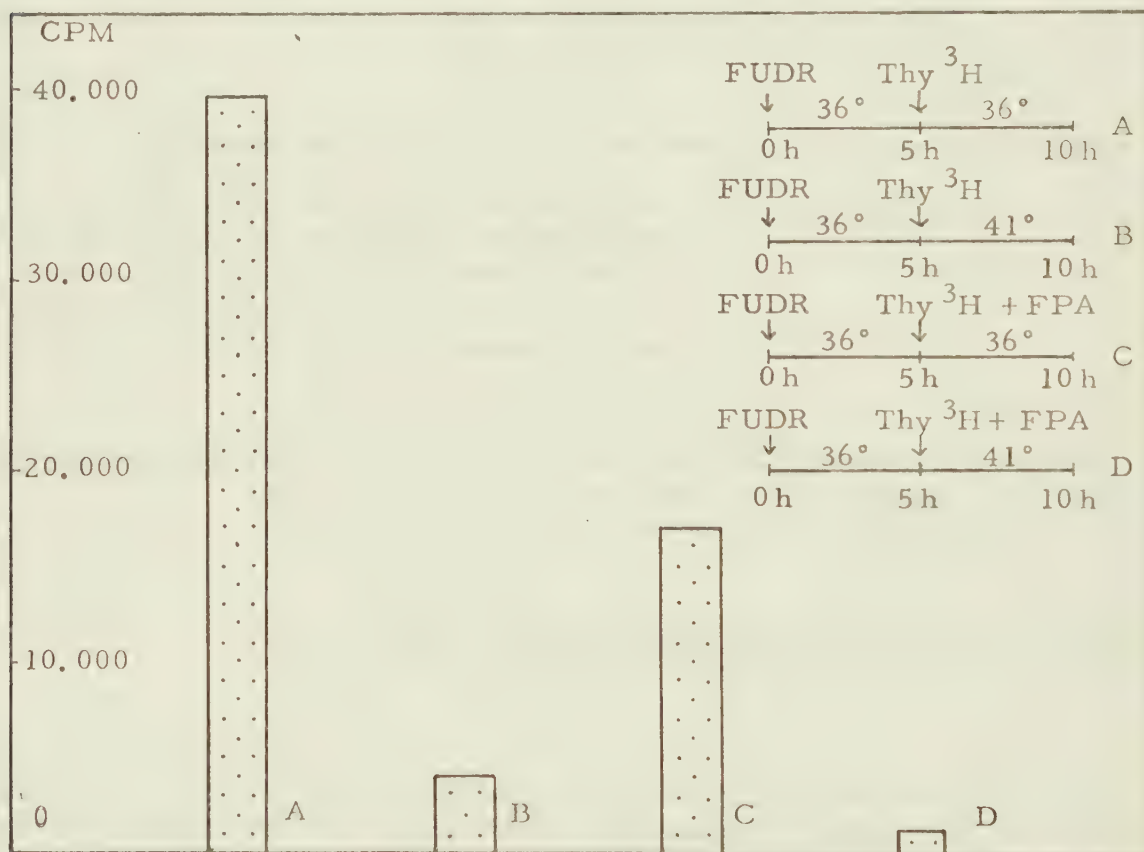


FIGURE 23. Etude comparée à 36 et à 41°C du fonctionnement des enzymes précoces du virus vaccinal synthétisés à 36°C par mesure de l'incorporation de thymidine ³H dans la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" du virus vaccinal. La thymidine ³H (0,03 µC/ml) est ajoutée à la cinquième heure.

Il nous a semblé intéressant de vérifier ces résultats avec la technique autoradiographique. La planche VI illustre les principaux aspects cyto-
logiques observés dans les cultures cellulaires infectées avec le mutant
"froid" VaMe 25°/16 et dans lesquelles on a procédé à une accumula-
tion des protéines précoces selon le protocole expérimental indiqué
dans la figure 23.

Sur la photo 6 on peut se rendre compte de la quantité de DNA viral
synthétisée à température optimale dix heures après l'infection. On
observe quatre à cinq inclusions cytoplasmiques bien individualisées
et de grande taille dans la plupart des cellules. Lorsqu'on a ajouté un
inhibiteur de la synthèse des protéines à la cinquième heure, les inclu-
sions, à la dixième heure, sont encore nettes, mais elles sont plus
petites et moins nombreuses (photo 8). Dans le cas d'un transfert
à 41°C à la cinquième heure, qu'on ajoute ou non du FPA, la synthèse
du DNA viral est très faible comme en témoignent les quelques inclu-
sions de petite taille qu'on aperçoit sur les photos 7 et 9.

Les résultats de cette étude autoradiographique confirment que le fonc-
tionnement des enzymes précoces formées à 36°C est perturbé à
température supra-optimale.

On peut alors se demander s'il s'agit d'une inactivation ou d'une simple
inhibition du fonctionnement des enzymes à température élevée. L'ex-
périence suivante nous permettra de répondre à cette question.

Des cellules infectées préincubées quatre heures à 36°C en présence
de FUDR sont transférées à 41°C pendant trente minutes, une, deux
et trois heures après qu'on ait ajouté de la puromycine. On revient
ensuite à 36°C pendant quatre heures et on mesure l'incorporation de
thymidine ³H dans la fraction cytoplasmique. La figure 24 rapporte
les résultats obtenus. On voit que plus le temps de séjour à 41°C est
long, plus la quantité de DNA viral synthétisée à 36°C est faible.

Les résultats de ces expériences permettent d'incriminer la thermosen-
sibilité des enzymes précoces dans le mécanisme de l'évènement thermo-
sensible portant sur la synthèse du DNA du virus vaccinal. Il n'est pas
établi, cependant, que ce phénomène soit à lui seul responsable de
l'inhibition de la synthèse du DNA à température supra-optimale car
nous n'avons, jusqu'à présent, aucune preuve que les enzymes précoces
sont synthétisées lorsque les cellules sont incubées à 41°C dès le
début de l'infection.

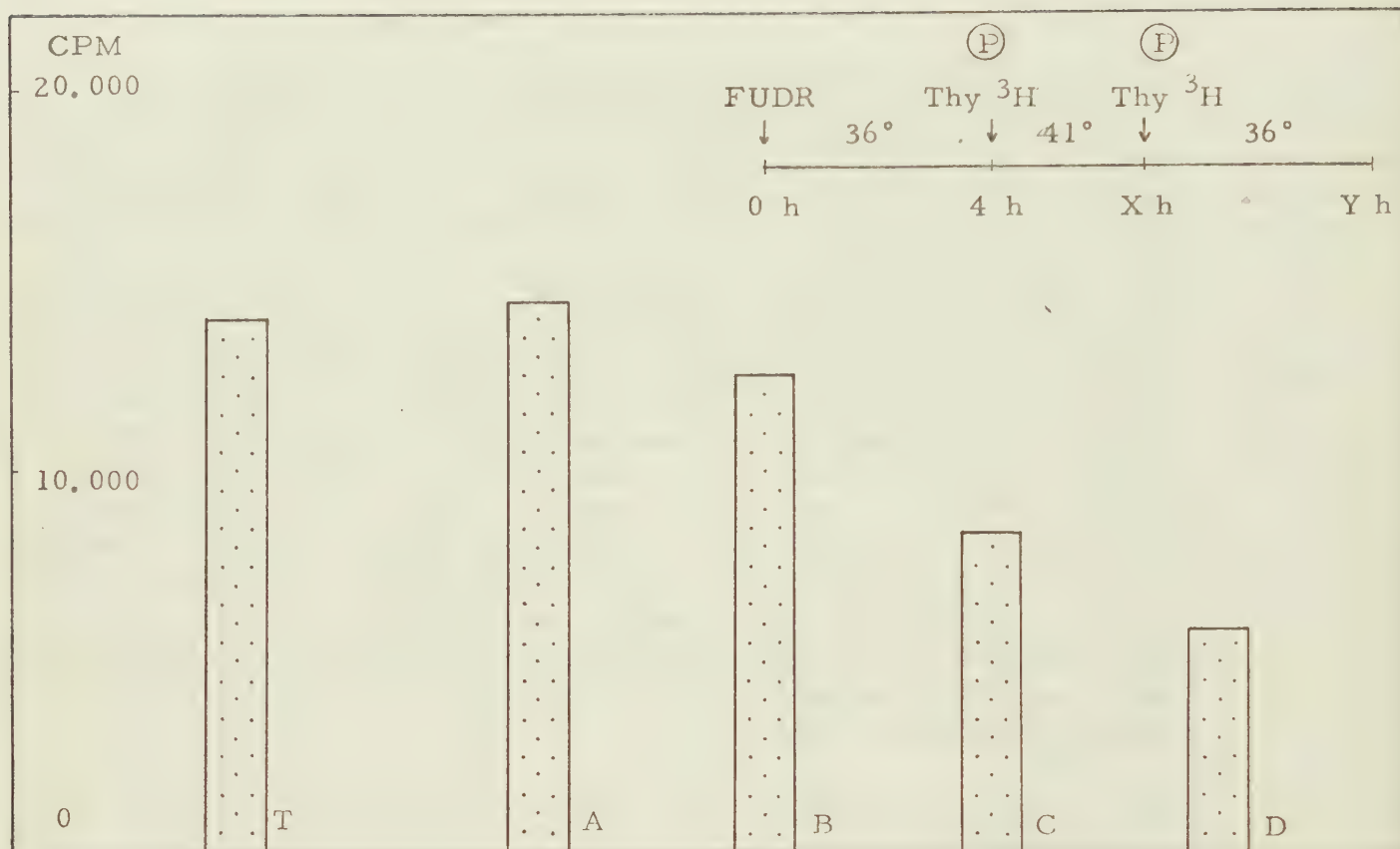
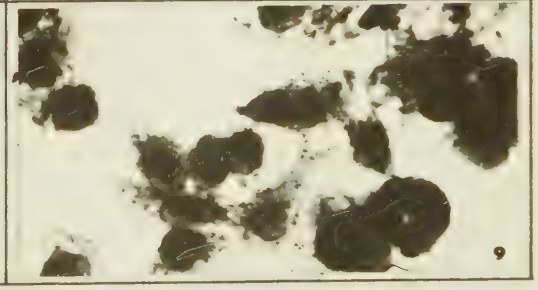
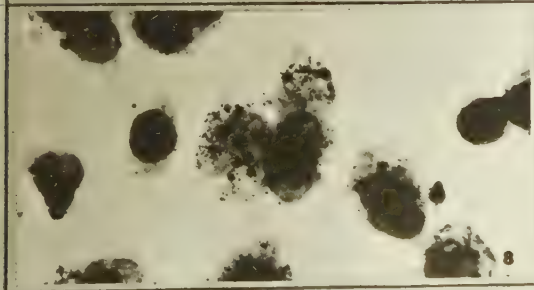
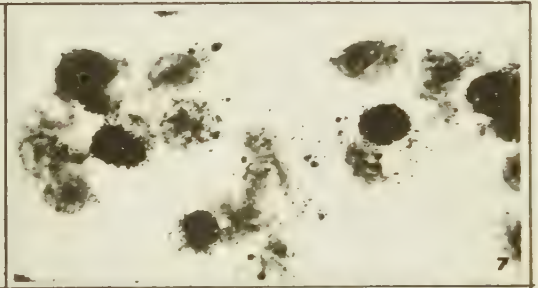
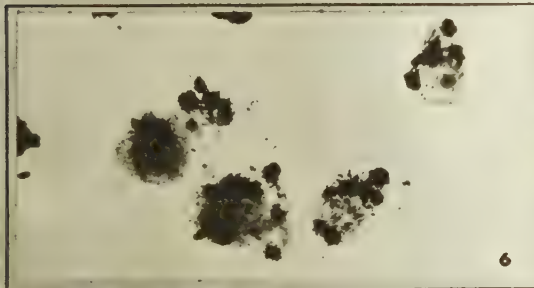
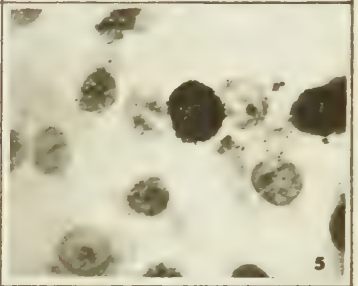
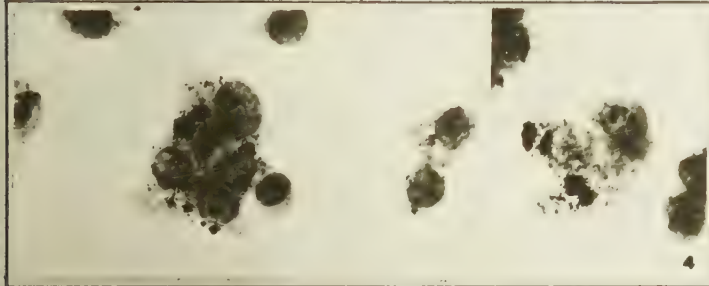
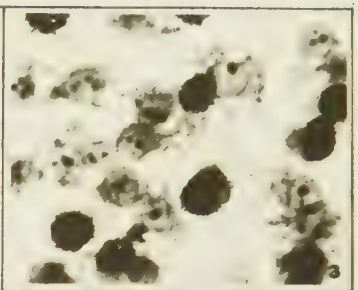
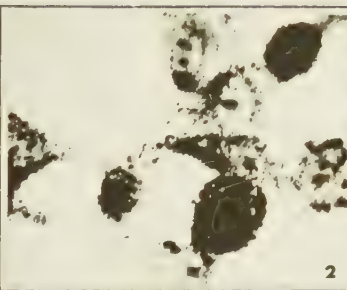
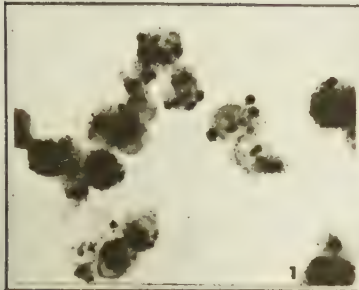


FIGURE 24. Incorporation de thymidine ³H dans la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" du virus vaccinal, après des passages de durée variable à 41°C quatre heures après l'infection.

Colonne T	pas de passage à 41°C	y = 8 heures
Colonne A	X = 4 heures 30	y = 8 heures 30
Colonne B	X = 5 heures	y = 9 heures
Colonne C	X = 6 heures	y = 10 heures
Colonne D	X = 7 heures	y = 11 heures

(P) = addition de puromycine.





III. ETUDE DE LA SYNTHÈSE ET DU FONCTIONNEMENT A TEMPÉRA- TURE SUPRA-OPTIMALE DES ENZYMES IMPLIQUÉES DANS LA REPLICATION DU DNA DU VIRUS VACCINAL.

Etant donné que les résultats qui viennent d'être exposés ne nous ont donné aucune indication sur la nature des protéines thermosensibles, nous nous sommes proposé d'étudier la synthèse et le fonctionnement à température supra-optimale des différentes protéines précoces apparaissant au cours de l'infection.

Parmi ces protéines, cinq enzymes à savoir : la thymidine kinase, la DNA polymérase et les trois DNases peuvent être étudiées "in vitro".

A) Synthèse et fonctionnement de la thymidine kinase à températures optimale et supra-optimale.

1) Cinétiques de la synthèse de la thymidine kinase dans les cellules KB infectées et maintenues à 36 et à 41°C.

L'activité de la thymidine kinase dans le cytoplasme des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 et maintenues à 36°C augmente régulièrement (Figure 25). Cinq heures après l'infection, elle est cinq fois plus élevée que celle observée dans la fraction cytoplasmique des cellules non infectées. Dans les cellules infectées et incubées à 41°C, l'activité enzymatique augmente également mais plus lentement ; cinq heures après l'infection elle n'est que deux fois plus importante que dans les cellules témoin non infectées.

Les dosages enzymatiques "in vitro" correspondant aux expériences mentionnées ci-dessus ont été effectués à 37°C. Lorsque la détermination de l'activité enzymatique est effectuée à 41°C, on note qu'elle est deux fois plus élevée, comme le montre le tableau IX.

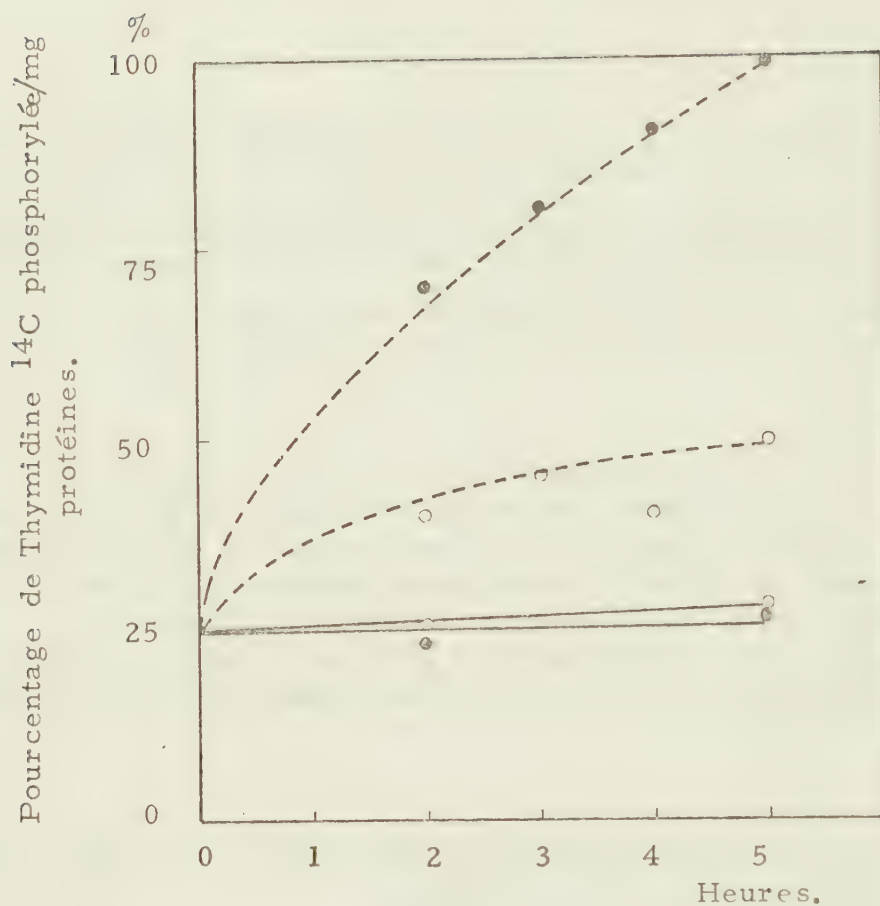


FIGURE 25. Cinétiques de la synthèse de la thymidine kinase dans la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal à 36 et à 41°C. L'activité enzymatique est mesurée par le pourcentage de thymidine ^{14}C phosphorylée par 1 mg de protéines.

- Cellules infectées maintenues à 36°C.
- Cellules infectées maintenues à 41°C.
- Cellules non infectées maintenues à 36°C.
- Cellules non infectées maintenues à 41°C.

Température de la réaction "in vitro"	Nature de la préparation enzymatique			
	Cellules témoin à 36°C	Cellules infectées à 36°C	Cellules témoin à 41°C	Cellules infectées à 41°C
37°C	13,2 pour 100	30,2 pour 100	18,5 pour 100	11 pour 100
41°C	26 pour 100	56,7 pour 100	30 pour 100	20,5 pour 100

TABLEAU IX. Activité "in vitro" de la thymidine kinase cytoplasmique à 37 et à 41°C. L'activité est exprimée par le pourcentage de thymidine ¹⁴C phosphorylée par mg de protéines.
Les cellules ont été prélevées trois heures après le début de l'infection.

Ces résultats démontrent que dans la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 et incubées à 41°C, la thymidine kinase virale est synthétisée. D'autre part, cette enzyme fonctionne parfaitement bien à 41°C "in vitro".

2) Cinétiques de la synthèse de la thymidine kinase dans les cellules L (TK⁻) infectées et maintenues à 36 et à 41°C.

Si les expériences qui viennent d'être exposées ne permettent pas de douter de l'existence d'une synthèse de la thymidine kinase à 41°C, elles ne nous renseignent cependant pas sur le fonctionnement de cette enzyme "in vivo". L'utilisation d'un système cellulaire déficient en thymidine kinase nous a semblé être un bon modèle expérimental non seulement pour étudier l'induction de la thymidine kinase virale mais également pour vérifier son bon fonctionnement à température supra-optimale. En effet, en mesurant l'incorporation de thymidine tritiée dans le noyau des cellules L (TK⁻) infectées avec le virus vaccinal, on obtient une preuve directe de l'activité de l'enzyme sans avoir besoin de recourir à un dosage "in vitro".

La figure 26 montre que dans les noyaux des cellules infectées, les taux d'incorporation du précurseur marqué évoluent parallèlement durant les deux premières heures de l'infection.

Mais alors qu'à 41°C l'activité enzymatique atteint un plateau vers la troisième heure, elle continue d'augmenter dans les cellules incubées à 36°C.

Ces résultats démontrent de façon indiscutable qu'à 41°C une synthèse de thymidine kinase est induite par le virus et que l'enzyme est capable de fonctionner "in vivo" à température supra-optimale.

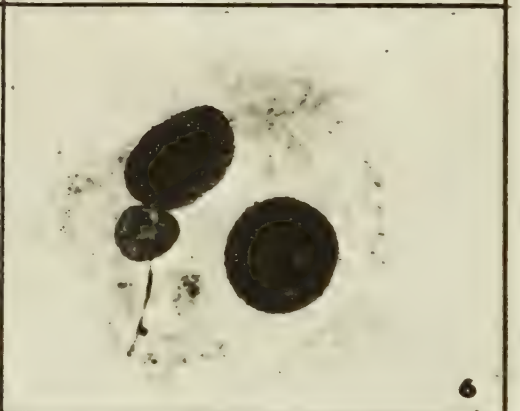
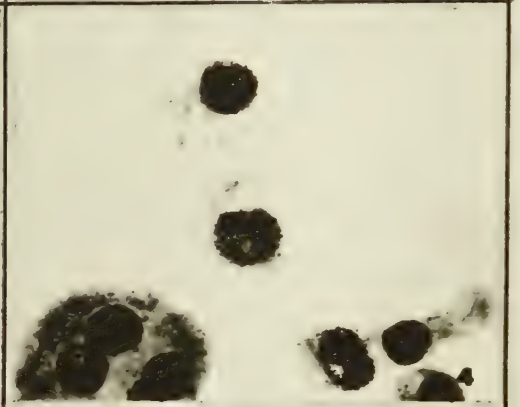
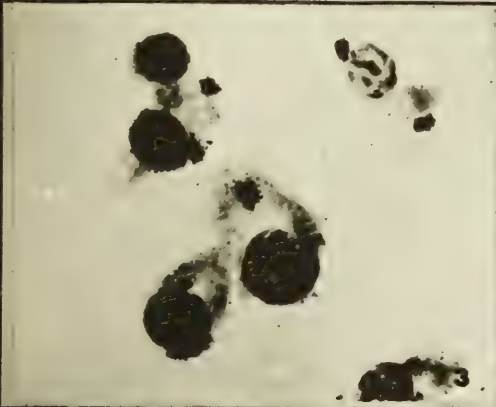
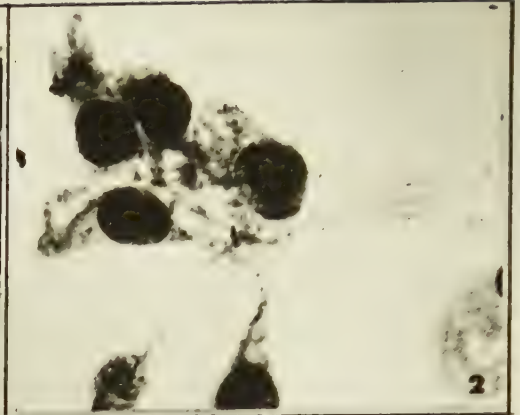
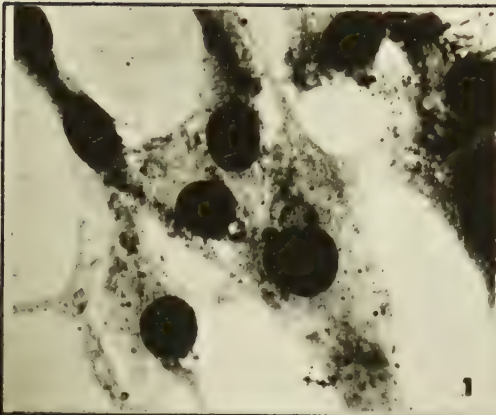
Comme on a pu le constater avec les cellules KB, il n'y a aucune répllication de DNA viral dans le cytoplasme des cellules L (TK⁻) maintenues à température supra-optimale.

Là encore nous avons cherché à confirmer ces résultats avec la technique autoradiographique. Sur les photos 1 et 2 de la planche VII, on peut observer des cellules L (TK⁻) non infectées incubées à 36 et à 41°C ; on voit qu'il n'y a aucune incorporation dans les noyaux. Si les cellules sont infectées et maintenues à 36°C (clichés 3 - 5 - 7) l'intensité du marquage des noyaux augmente avec le temps et il apparaît des inclusions cytoplasmiques.

Dans les cellules infectées incubées à 41°C (clichés 4 - 6 - 8) on distingue également de nombreux grains d'argent dans les noyaux mais il n'y a aucune inclusion dans le cytoplasme. Il convient de noter cependant que l'intensité du marquage est plus faible qu'à 36°C.

Ces expériences permettent de conclure que dans la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées à 41°C avec le mutant "froid" VaMe 25^o/16 la synthèse de la thymidine kinase s'effectue en l'absence de répllication de DNA viral. Le fonctionnement de cette enzyme est stimulé à 41°C "in vitro".

D'autre part, le fait qu'on observe un marquage des noyaux des cellules L (TK⁻) à température supra-optimale lorsqu'elles sont infectées avec le mutant "froid" démontre que la thymidine kinase fonctionne "in vivo".



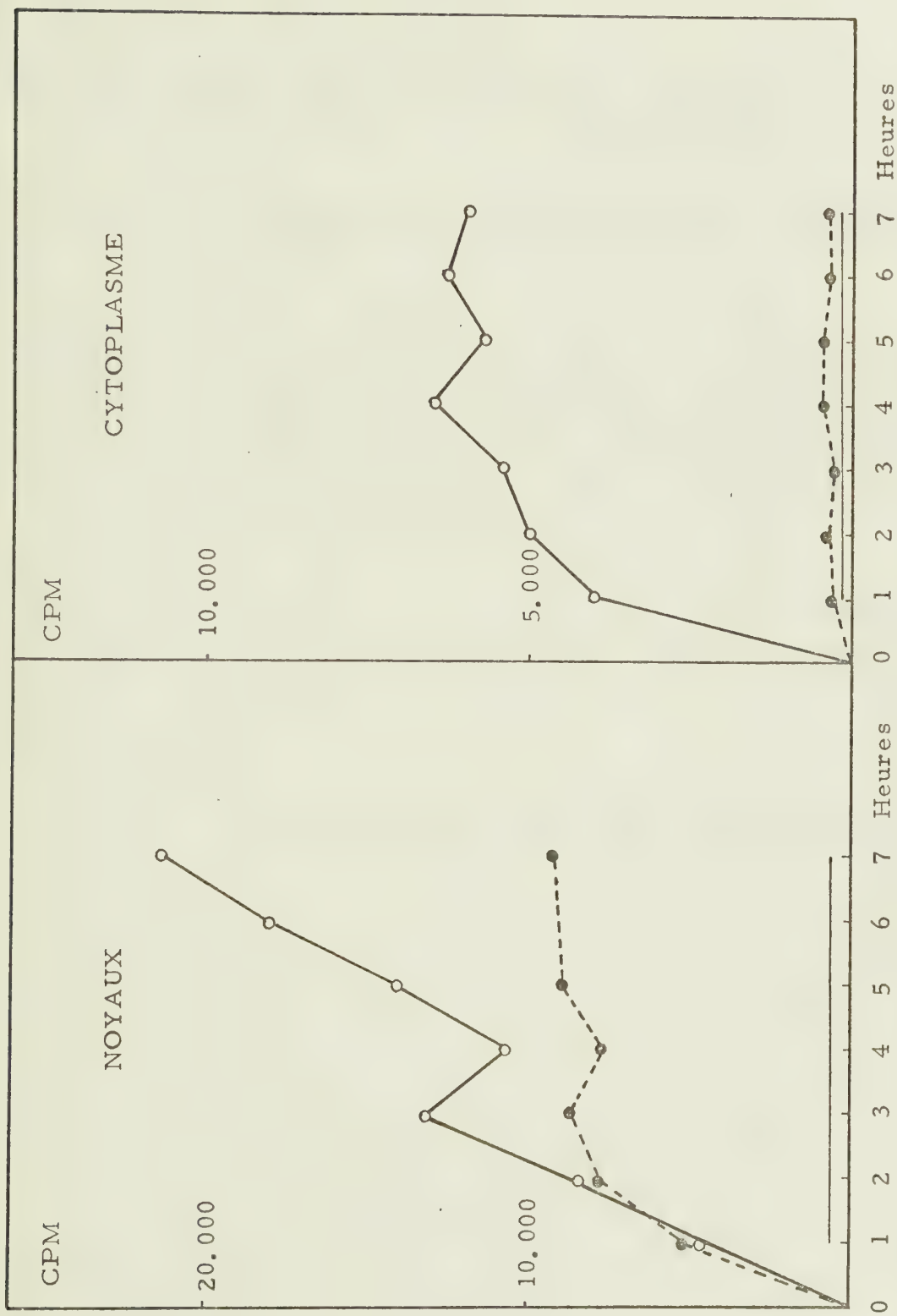


FIGURE 26. Incorporation de thymidine ^3H dans le noyau et la fraction cytoplasmique des cellules L (TK-) infectées à 36 et à 41°C avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal.

- — Cellules infectées et maintenues à 36°C.
- - - - Cellules infectées et maintenues à 41°C.
- — Cellules non infectées et maintenues à 36 et à 41°C.

La thymidine ^3H (0, 12 $\mu\text{C}/\text{ml}$) a été ajoutée au temps 0.

B) Synthèse et fonctionnement de la DNA polymérase virale à températures optimale et supra-optimale.

1) Cinétique de la synthèse de la DNA polymérase à 36°C.

Dans le cytoplasme des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal et incubées à 36°C, l'activité de la DNA polymérase augmente régulièrement jusqu'à la troisième heure après l'infection. Elle atteint ensuite un plateau qui se maintient au-delà de la septième heure. L'activité enzymatique à 36°C est en-

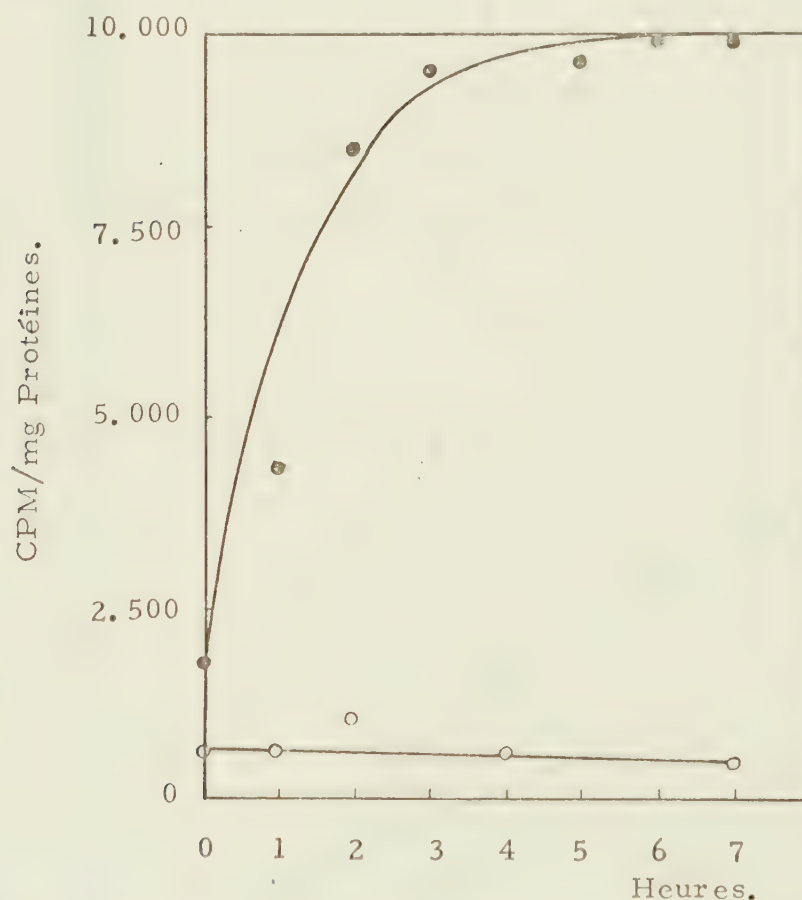


FIGURE 27. Cinétique de la synthèse de la DNA polymérase à 36°C dans la fraction cytoplasmique des cellules KB.

- Cellules infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal.
- Cellules non infectées.

viron cinq fois plus élevée que celle observée dans les cellules témoin non infectées comme le montre la figure 27.

2) Cinétiques comparées de la synthèse de la DNA polymérase à 36 et à 41°C.

Lorsque l'adsorption est effectuée à 41°C et que les cellules sont maintenues à cette température durant toute l'expérience, la courbe qui traduit l'activité enzymatique au cours des deux premières heures de l'infection croît parallèlement à celle notée à 36°C. Un léger ralentissement se manifeste vers la deuxième heure, et le rendement maximum, qui est deux fois et demie à quatre fois plus élevé que dans les cellules non infectées, est observé vers la troisième ou la quatrième heure selon les expériences.

On constate ensuite une décroissance régulière de l'activité enzymatique qui atteint à la septième heure une valeur identique à celle observée dans la fraction cytoplasmique des cellules non infectées. Dans la figure 28 sont reproduites les courbes représentant la moyenne de quatre expériences.

3) Fonctionnement "in vitro" de la DNA polymérase extraite du cytoplasme des cellules infectées incubées à 36 et à 41°C.

Nous avons étudié l'influence des températures supra-optimales sur la réaction effectuée "in vitro" avec des préparations enzymatiques provenant de cellules infectées incubées à 36 ou à 41°C. Nous avons également recherché quel était l'effet d'une préincubation de trente minutes à 36 ou à 41°C sur le fonctionnement de la DNA polymérase "in vitro". Les résultats de ces expériences sont inscrits dans le tableau X. Lorsque les extraits cytoplasmiques proviennent de cellules infectées incubées à 36 ou à 41°C, l'activité enzymatique est environ deux fois plus élevée si la réaction "in vitro" est effectuée à 41°C. On voit d'autre part qu'une préincubation de la fraction cytoplasmique durant trente minutes à 41°C n'a aucune influence sur le fonctionnement de l'enzyme à température optimale.

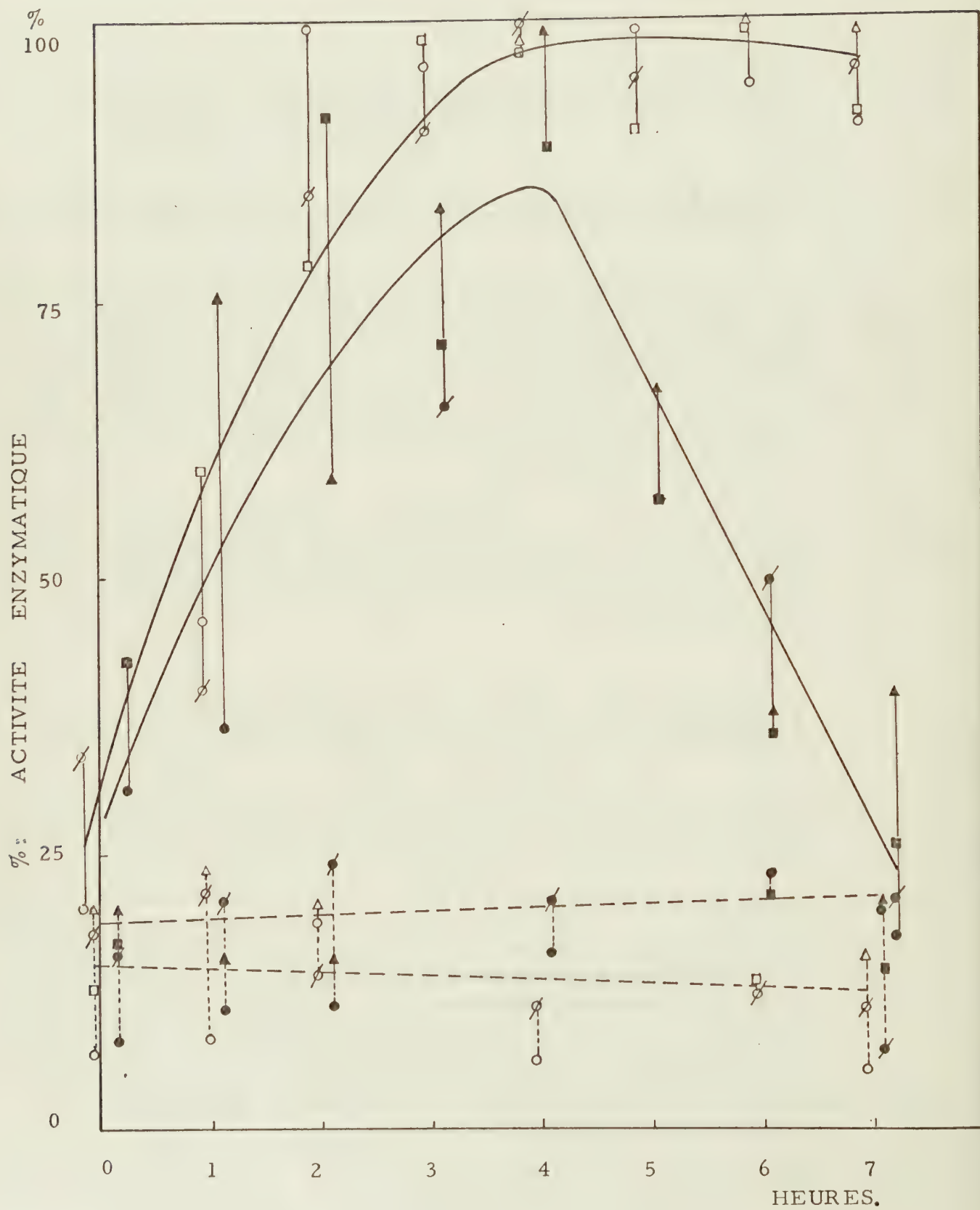


FIGURE 28.

FIGURE 28. Activités comparées de la DNA polymérase extraite de la fraction cytoplasmique de cellules KB non infectées et infectées avec 20 UFP/cellule du mutant "froid" du virus vaccinal et incubées à 36 ou à 41°C.

- Cellules infectées et maintenues à 36°C.
 ▲—●—■ Cellules infectées et maintenues à 41°C.
 ○---○---□ Cellules non infectées et maintenues à 36°C.
 ▲---●---■ Cellules non infectées et maintenues à 41°C.

Température de la réaction "in vitro"			Nature de la préparation enzymatique			
			Cellules témoin à 36°C	Cellules infectées à 36°C	Cellules témoin à 41°C	Cellules infectées à 41°C
37°C	Pas de préincubation de la préparation enzymatique		400	1.300	359	873
	Préincubation 30 minutes à 36°C		104	1.427	379	918
	Préincubation 30 minutes à 41°C		150	1.100	370	1.033
41°C	Pas de préincubation de la préparation enzymatique		263	2.737	700	1.900

TABEAU X. Activité "in vitro" de la DNA polymérase à 37 et à 41°C.

L'activité est exprimée en CPM/mg de protéines. Les cellules ont été prélevées trois heures après le début de l'infection.

C) Synthèse et fonctionnement des désoxyribonucléases à températures optimale et supra-optimale.

1) Désoxyribonucléase neutre.

Dans le cytoplasme des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 et incubées à 36°C l'activité de la DNase neutre augmente régulièrement. Quatre heures après l'infection elle est huit fois plus importante que celle observée dans le cytoplasme des cellules non infectées.

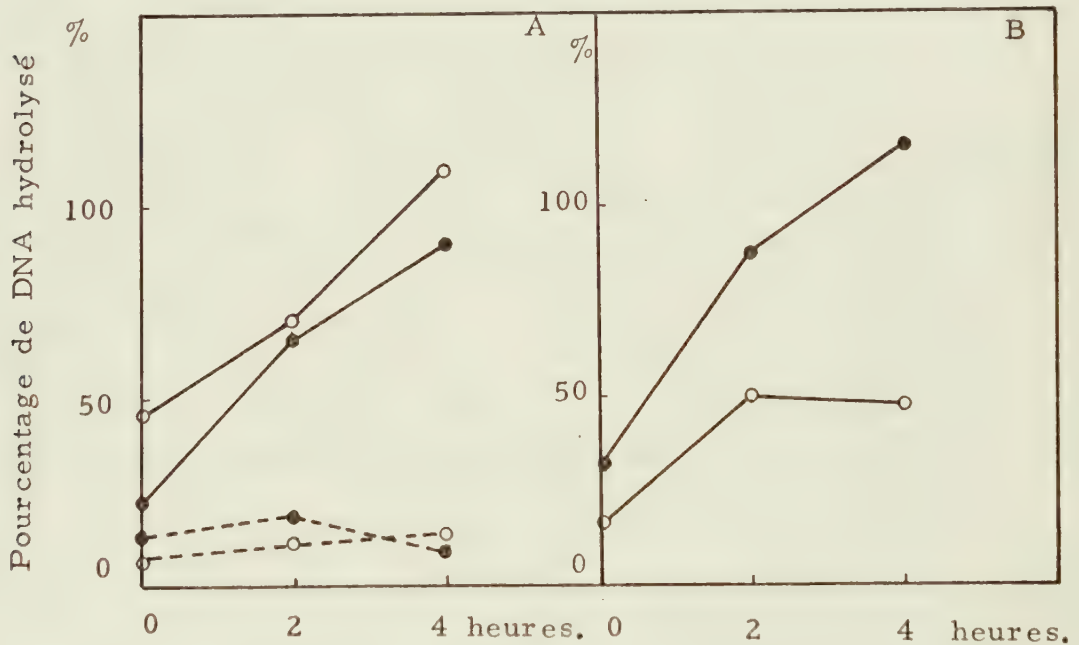


FIGURE 29. Cinétiques de la synthèse de la DNase neutre dans les cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal et maintenues à 36 et à 41°C.

- Cellules infectées maintenues à 36°C.
- Cellules infectées maintenues à 41°C.
- Cellules non infectées maintenues à 36°C.
- Cellules non infectées maintenues à 41°C.

Les figures A et B correspondant à deux expériences différentes.

Dans les cellules incubées à 41°C durant les quatre premières heures nous avons trouvé une activité soit identique soit inférieure à celle notée à 36°C comme le montrent les courbes A et B de la figure 29.

Nous avons étudié l'influence des températures élevées sur l'activité de l'enzyme "in vitro" avec des préparations provenant de cellules infectées et maintenues soit à 36 soit à 41°C. Le tableau XI montre que l'activité enzymatique est plus élevée quand la réaction "in vitro" est effectuée à 41°C.

Température de la réaction "in vitro".	Nature de la préparation enzymatique			
	Cellules témoin à 36°C	Cellules infectées à 36°C	Cellules témoin à 41°C	Cellules infectées à 41°C
37°C	11,9 p 100	92,3 p 100	11,2 p 100	107 p 100
41°C	16 p 100	120 p 100	13,2 p 100	166 p 100

TABLEAU XI. Activité "in vitro" de la DNase neutre à 37 et à 41°C. L'activité est exprimée par le pourcentage de DNA radioactif rendu acido-soluble par mg de protéines. Les cellules ont été prélevées quatre heures après le début de l'infection.

2) Désoxyribonucléase basique.

Dans le cytoplasme des cellules infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 et maintenues à 36°C on remarque que l'activité de la désoxyribonucléase augmente à partir de la quatrième heure après l'infection comme en témoigne la courbe de la figure 30. A 41°C cette activité est négligeable ; elle est du même ordre de grandeur que celle trouvée dans le cytoplasme des cellules témoin non infectées.

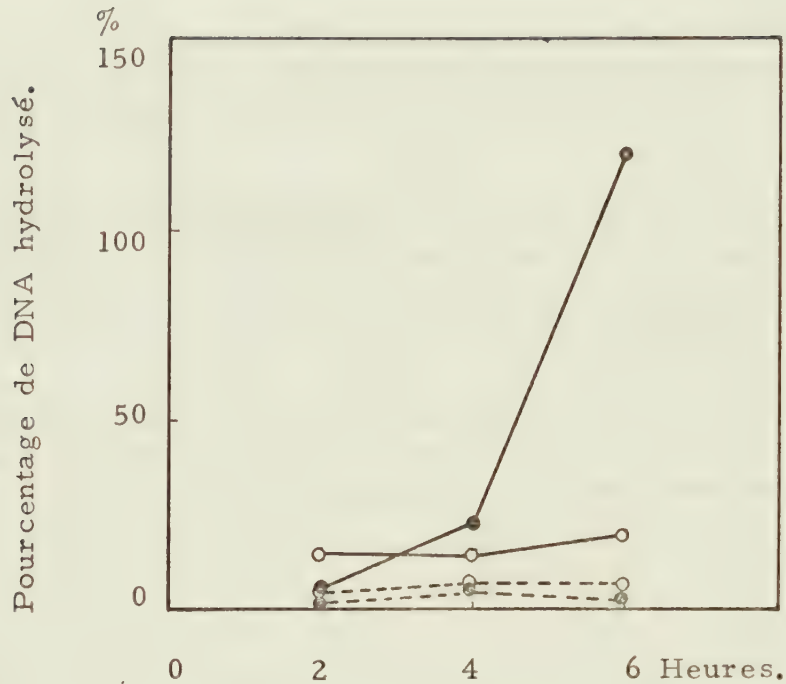


FIGURE 30. Cinétiques de la synthèse de la DNase basique dans des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal et maintenues à 36 et à 41°C.

- Cellules infectées maintenues à 36°C.
- Cellules infectées maintenues à 41°C.
- Cellules non infectées maintenues à 36°C.
- Cellules non infectées maintenues à 41°C.

L'étude de l'influence de la température sur la réaction enzymatique "in vitro" montre là également une stimulation de l'activité de l'enzyme quand la réaction est effectuée à 41°C (tableau XII).

3) Désoxyribonucléase acide.

MAC AUSLAN et KATES (151) ont montré que la DNase acide du virus cowpox se présente sous deux formes : une forme soluble qui apparaît à la troisième heure après l'infection et une forme liée qui n'est pas détectable avant la sixième heure et dont l'activité augmente jusqu'à la dix-huitième heure. Pour mettre en évidence cette forme liée il convient de traiter les cellules au

Température de la réaction "in vitro"	Nature de la préparation enzymatique	
	Cellules infectées à 36°C	Cellules infectées à 41°C
37°C	30 pour 100	4,9 pour 100
41°C	52 pour 100	18,2 pour 100

TABLEAU XII. Activité "in vitro" de la DNase basique à 37 et à 41°C. L'activité est exprimée par le pourcentage de DNA radioactif rendu acido-soluble par mg de protéines. Les cellules sont prélevées six heures après le début de l'infection.

désoxycholate de sodium qui rompt les membranes auxquelles est fixée la forme liée de l'enzyme.

L'examen de la figure 31 montre, dans des cellules infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal et maintenues à 36°C, une activité DNasique dans la fraction particulaire traitée au DOC ; cette activité augmente entre la huitième et la seizième heure. Par contre la fraction soluble et la fraction particulaire non traitée au désoxycholate de sodium révèlent une activité très faible ; celle-ci est de cinq à huit fois moins élevée que celle mesurée dans la fraction traitée au désoxycholate.

Dans des cellules infectées et maintenues à 41°C, aucune des fractions éprouvées ne possèdent d'activité DNasique.

Les trois fractions enzymatiques extraites de cellules infectées et incubées à 36°C ont été éprouvées "in vitro" à 41°C ; leur activité reste identique à celle mesurée à 37°C (Tableau XIII).

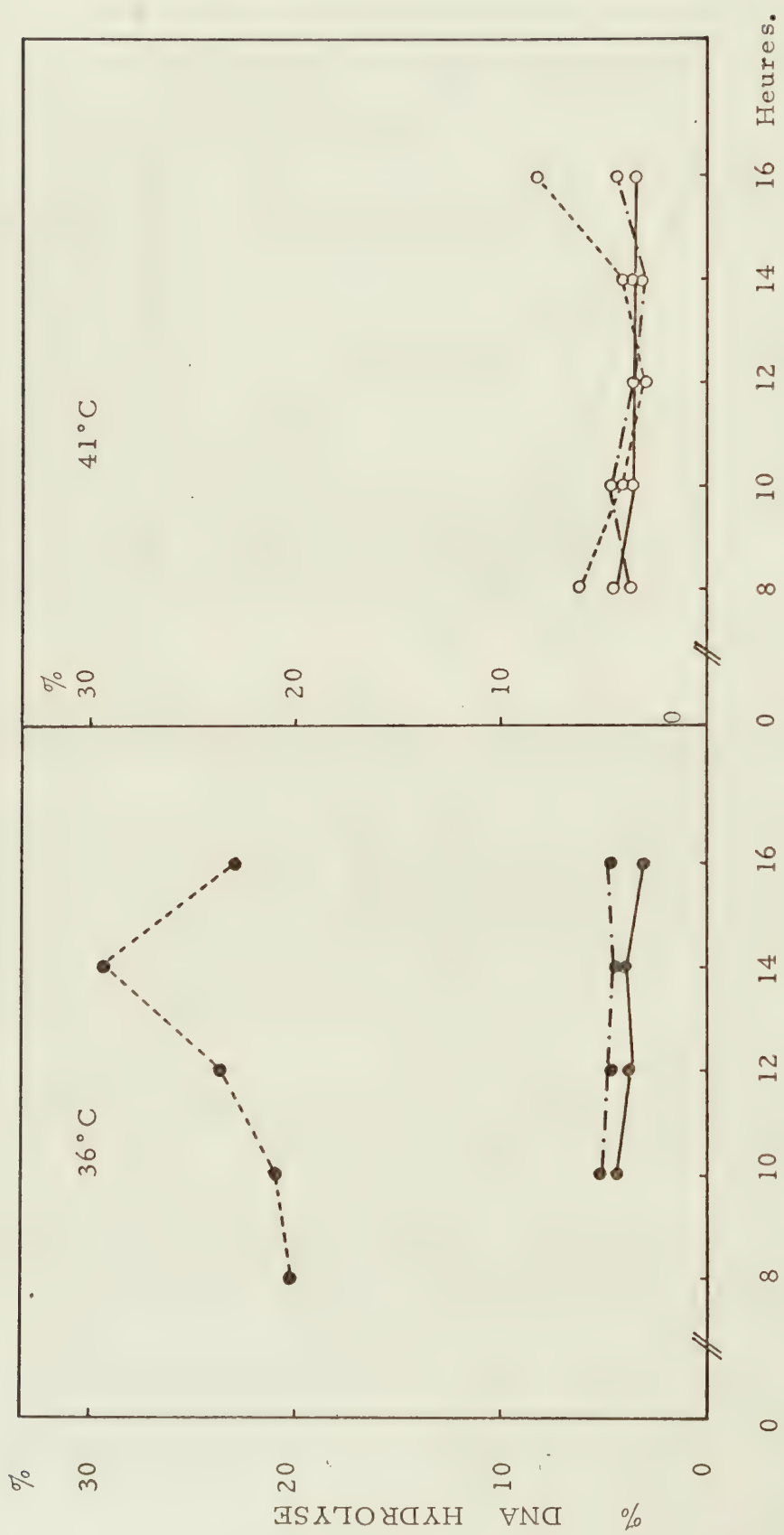


FIGURE 31. Cinétiques de la synthèse de la DNase acide dans des cellules KB infectées avec le mutant "froid" VaMe 25°/16 du virus vaccinal à 36°C (●) et à 41°C (○).

— Fraction soluble - - - - - fraction particulaire non traitée
 - - - - - Fraction particulaire traitée au désoxycholate de sodium

Température de la réaction "in vitro"	Nature de la préparation enzymatique		
	Fraction soluble	Fraction particulaire traitée au DOC	Fraction particulaire
37°C	3,7 pour 100	23,7 pour 100	4,7 pour 100
41°C	3,4 pour 100	27,3 pour 100	5 pour 100

TABLEAU XIII. Activité "in vitro" de la DNase acide mesurée dans les trois fractions enzymatiques isolées de cellules infectées et maintenues à 36°C pendant douze heures. L'activité est exprimée par le pourcentage de DNA radioactif rendu acido-soluble en trente minutes à 37 ou à 41°C.

x
x x



DISCUSSION



L'étude de la replication du DNA du virus vaccinal dans les cellules KB incubées à température optimale et à température supra-optimale nous a conduit à utiliser deux techniques différentes : l'autoradiographie et l'incorporation de thymidine marquée dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique. Les avantages et les désavantages de chacune des méthodes méritent d'être brièvement discutés ici.

L'autoradiographie s'applique particulièrement bien à l'étude du développement des désoxyribovirus à multiplication cytoplasmique. Elle permet, en effet, de différencier facilement le DNA de la cellule hôte de celui des virions.

Certains systèmes cellulaires sont plus appropriés que d'autres à l'utilisation de cette technique. Jean GUIR (153) a discuté les avantages des cellules rénales de fœtus de veau qui présentent une masse cytoplasmique plus importante que les cellules KB et qui sont relativement résistantes à l'action toxique du virus, ce qui permet d'observer les stades les plus avancés de l'infection. Quoi qu'il en soit, les résultats que nous avons obtenus ont été faciles à interpréter et se sont toujours montrés parfaitement reproductibles. De par sa haute sensibilité l'autoradiographie offre, en outre, la possibilité de distinguer de très faibles synthèses de DNA dans les cellules.

Cependant, cette technique convient moins bien pour des études cinétiques. Le dénombrement en fonction du temps des cellules présentant des inclusions permet certes d'apprécier l'allure de la cinétique de replication du DNA viral, mais ne donne que des renseignements insuffisants sur la quantité de DNA formée à un moment donné. Les différences que nous avons observées dans les résultats obtenus avec la méthode autoradiographique et la technique d'incorporation de thymidine ^{14}C dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique des cellules rénales de fœtus de veau en témoignent (154 - 155). A 41°C , 50 pour 100 des cellules infectées présentent une ou plusieurs inclusions, mais la quantité de DNA mesurée par incorporation de thymidine ^{14}C n'est que de 20 pour 100 de celle trouvée dans les cellules infectées et incubées à 36°C . Ceci est dû au fait qu'à 36°C la plupart des cellules renferment trois à quatre inclusions, alors qu'à température supra-optimale, on ne trouve en général qu'une seule inclusion par cellule.

Pour suivre la replication du DNA viral par incorporation de thymidine ^{14}C dans la fraction cytoplasmique des cellules KB, nous avons été amenés à modifier la technique préconisée par JOKLIK et BECKER (138)

En effet, en nous plaçant dans les conditions expérimentales décrites par ces auteurs, on constate que le cytoplasme des cellules non infectées contient des quantités non négligeables de précurseur radioactif. La précipitation des macromolécules de la fraction cytoplasmique par de l'acide trichloracétique permet d'éliminer la thymidine radioactive libre et ses composés phosphorylés.

Cependant, cette modification ne permet pas d'éviter une augmentation de l'incorporation du précurseur dans la fraction nucléaire. Ce phénomène déjà observé par JUNGWIRTH et DAWID (156) a été attribué par MAGEE et MILLER (157) à une contamination des noyaux par des constituants viraux entraînés lors de la centrifugation. Des études au microscope électronique nous ont montré, en effet, que la fraction nucléaire obtenue par un simple broyage des cellules infectées est fortement contaminée par des débris de cytoplasme contenant des viroplasmes. C'est pourquoi, nous avons traité le culot nucléaire par de l'acide citrique 0,1 M comme l'ont fait DOUNCE (145) et HANAFUSA (146) ce qui permet de débarrasser les noyaux des viroplasmes qui y sont fixés et de récupérer la majorité du DNA viral dans la fraction cytoplasmique. Dans ces conditions, les résultats que nous avons obtenus sont parfaitement reproductibles.

La cinétique de la synthèse du DNA des Poxvirus à température optimale a été étudiée par de nombreux auteurs.

Les premiers travaux en autoradiographie entrepris par CAIRNS (158), KATO et collaborateurs (159), KIT et collaborateurs (160), SHEEK et MAGEE (161) et TERRINHA et collaborateurs (140) ont confirmé que la replication du DNA du virus vaccinal s'effectue dans le cytoplasme. Ces recherches n'ont cependant apporté que peu de données quantitatives. JOKLIK et BECKER (138), par incorporation de thymidine ^{14}C dans le cytoplasme des cellules HeLa infectées avec le virus de la vaccine, observent que la replication du DNA viral débute une heure à une heure trente après l'infection pour atteindre un pic entre deux heures et deux heures trente et retomber pratiquement à zéro à la cinquième heure. D'après ces auteurs, plus de 90 pour 100 du DNA viral est synthétisé quatre heures trente après l'infection.

En utilisant un inhibiteur métabolique, la fluorodésoxyuridine (FUDR), SALZMAN (54), SALZMAN et collaborateurs (119 - 121) ont démontré que la synthèse du DNA viral débute à la deuxième heure pour se terminer à la sixième heure. Le début de la replication du DNA précède ainsi de trois à quatre heures la maturation des virions.

Dans notre système expérimental les premières inclusions de DNA apparaissent une heure trente après l'infection. Entre deux et quatre heures la vitesse de formation des inclusions est la plus élevée et un plateau est atteint à la sixième heure au moment où apparaissent les premiers virions. Les résultats obtenus par incorporation de thymidine ^{14}C dans la fraction cytoplasmique confirment les données autoradiographiques et sont en accord avec ceux rapportés par les auteurs sus-cités. Si des différences sont observées dans la chronologie des étapes qui mènent à la formation des virions elles proviennent pour la plus grande part des systèmes cellulaires et des souches virales employées.

A température supra-optimale, quelque soit la technique utilisée, nous n'avons jamais pu mettre en évidence de synthèse de DNA viral dans des cellules KB infectées avec le virus vaccinal et incubées à 41°C dès le début de l'infection. Vu la grande sensibilité de la méthode autoradiographique il semble bien qu'une faible synthèse de DNA viral à 41°C puisse être exclue.

Toutefois, BASILICO et JOKLIK (162) ont pu observer une synthèse de DNA à 39°C dans des cellules HeLa infectées avec un mutant thermosensible isolé à partir de la souche WR et dont le développement viral est inhibé à cette température. Comparée à la synthèse de DNA obtenu avec la souche sauvage à 39°C , celle du mutant thermosensible débute avec une à deux heures de retard et son rendement n'est que de 30 à 50 pour 100.

Nous avons vu que lorsqu'on effectue des transferts de 36 à 41°C au cours de la phase primaire, il y a une inhibition de la replication du DNA viral. En plus, on observe une dégradation de l'acide nucléique qui a été formé à température optimale. Les causes de cette dégradation ne sont pas claires. On peut cependant exclure la formation d'une enzyme responsable de cette digestion puisque l'adjonction de puromycine ne modifie en rien le phénomène observé.

On peut envisager alors qu'il y ait une stimulation de nucléases cellulaires préexistantes ou encore un dysfonctionnement à 41°C d'une enzyme virale. En effet, comme l'ont montré GUIR et collaborateurs (155), le DNA viral formé à 36°C dans les cellules rénales de fœtus de veau est sensible à la DNase jusqu'à la sixième heure, c'est-à-dire pendant toute la phase primaire.

Une dégradation du RNA du poliovirus à température supra-optimale a également été observée par FIZMAN et collaborateurs (163).

Ces auteurs pensent que cette dégradation est due à un dysfonctionnement des DNases d'origine virale en ce sens que l'équilibre replicase $\rightleftharpoons$ nucléase est déplacé vers la droite par les températures élevées. Récemment LWOFF (communication personnelle) a émis l'hypothèse qu'à température élevée il pourrait y avoir des lésions des lysosomes. Dans une cellule infectée avec le poliovirus, il y aurait une compétition entre l'activité des enzymes lysosomiques et celle des enzymes responsables de la replication du RNA viral. A température supra-optimale, du fait de la libération massive de nucléases lysosomiques, les phénomènes de dégradation l'emporteraient sur le processus de replication.

Dans la cas du virus vaccinal, nous n'avons pour le moment aucune indication qui puisse apporter des arguments à cette théorie. Cependant, il convient de remarquer que le DNA parental n'est pas touché par cette dégradation ; en effet, dans des cultures qui ont été infectées par le virus vaccinal et maintenues quatre heures à 41°C, puis transférées à 36°C, la replication du DNA viral s'effectue quasi normalement.

Alors que sur cellules KB la replication du DNA du virus vaccinal est complètement inhibée à 41°C, SCHERRER et collaborateurs (164), GUIR (153), BURKARD et collaborateurs (154) ont obtenu des résultats différents en utilisant des cellules rénales de fœtus de veau.

Raoul SCHERRER, en dénombrant les inclusions colorées à l'acridine orange qui apparaissent dans le cytoplasme des cellules rénales de fœtus de veau infectées avec le virus vaccinal et incubées à 41°C, montre que la synthèse du DNA est en retard de deux heures sur celle observée à 36°C. Malgré l'absence de virions à 41°C, 80 pour 100 des cellules renferment des inclusions de DNA dix heures après l'infection.

Jean GUIR a observé par autoradiographie une synthèse de DNA viral à 41°C sur des cellules rénales de fœtus de veau ; cette synthèse accuse un retard de deux heures sur celle notée à 36°C. Les inclusions de DNA ressemblent en tous points à celles formées à 36°C, cependant leur nombre dans une même cellule est moins élevé. D'autre part si le pourcentage maximum de cellules synthétisant du DNA viral est de 100 pour 100 à 36°C, il n'est que de 50 pour 100 à 41°C.

A température supra-optimale la dispersion des grains d'argent à partir des centres de synthèse est un phénomène très rare : le DNA viral synthétisé à 41°C reste localisé au niveau des centres de synthèse et demeure sensible à l'action de la DNase tout au long du cycle infectieux. Cela démontre que l'encapsidation n'a pas lieu à température supra-optimale et semble être en rapport avec l'absence de formation de virions à 41°C.

BURKARD et collaborateurs pour leur part ont confirmé le retard de deux heures de la replication du DNA vaccinal sur cellules rénales de fœtus de veau infectées et incubées à 41°C. En suivant l'incorporation de thymidine ^{14}C dans la fraction cytoplasmique, ils ont montré que la synthèse du DNA se poursuit jusqu'à la huitième heure et qu'elle est environ cinq fois moins importante qu'à 36°C.

Quoique sur cellules rénales de fœtus de veau le développement du virus vaccinal soit inhibé à température supra-optimale, la replication du DNA viral peut s'effectuer en partie. L'inhibition de la synthèse du DNA viral par les températures supra-optimales dépend donc du système cellulaire utilisé : sur cellules KB cette synthèse est complètement bloquée alors qu'elle ne l'est que partiellement sur cellules rénales de fœtus de veau. Une observation analogue a été faite par CRUICKSHANK et BEDSON (69) à propos du virus de la variole dont le DNA n'est pas synthétisé à température supra-optimale sur cellules HeLa alors qu'il l'est sur fibroblastes d'embryon de poulet. S'il est difficile de fournir une explication à ces observations, elles confirment cependant le récent travail de LAB et KIRN (77) qui ont clairement démontré l'existence d'une participation cellulaire à l'inhibition du développement viral par la température.

Nous avons constaté pour notre part (résultats non publiés) que les cellules KB sont plus sensibles à l'effet des températures élevées que les cellules rénales de fœtus de veau ; l'incorporation de thymidine ^3H dans les noyaux des cellules KB non infectées est moins importante à 41°C qu'à 36°C, alors que dans les cellules rénales de fœtus de veau on note une activité métabolique identique aux deux températures. Les taux d'incorporation élevés que l'on observe sur cellules KB à 41°C permettent cependant d'affirmer que les enzymes de phosphorylation fonctionnent à haute température. L'autoradiographie confirme cette observation, puisque sur des cellules KB et L (TK⁻) incubées pendant huit heures à 41°C on note la présence de noyaux marqués, alors que dans le cytoplasme il n'y a aucune inclusion de DNA viral. Une

preuve supplémentaire de la présence des enzymes de phosphorylation dans les cellules KB incubées à 41°C est fournie par le travail de G. DOLLE (165) qui a montré qu'un mutant chaud du virus vaccinal est parfaitement capable d'induire la synthèse de DNA viral à température supra-optimale.

JUNGWIRTH et JOKLIK (149), KATES et MAC AUSLAN (152) ont montré qu'une synthèse de protéines virales est induite dès les premières heures qui suivent l'infection de cellules avec les Poxvirus. Lorsque cette synthèse est inhibée par la puromycine ou par la cycloheximide, la replication du DNA viral n'a pas lieu. Nous avons vu qu'en effectuant des transferts de 41 à 36°C, il faut qu'une nouvelle synthèse de protéines ait lieu pour que l'on puisse observer une synthèse de DNA viral. Ceci permet de penser qu'une ou plusieurs protéines sont impliquées dans le mécanisme de la thermo-inhibition. Pour étudier les protéines précoces impliquées dans le processus de la replication du DNA du virus du rabbitpox, KATES et MAC AUSLAN (152) ont décrit un système expérimental qui permet l'accumulation des protéines précoces nécessaires aux mécanismes de la synthèse du DNA viral. Appliquée à l'étude de la thermosensibilité du développement du virus vaccinal, cette technique nous a permis de conclure que l'inactivation à 41°C d'une ou plusieurs protéines impliquées dans la replication du génome viral conduit à l'inhibition de la synthèse du DNA viral. L'objection qu'une modification de la matrice à 41°C puisse empêcher un fonctionnement normal des enzymes peut être rejetée étant donné qu'un séjour de quelques heures à 41°C, au début de l'infection, n'affecte pas la replication du DNA viral après un transfert à 36°C.

Il convient de remarquer que, dans ce type d'expériences, on note un niveau relativement élevé de l'incorporation de thymidine ^3H dans le DNA. Cela tient au fait que le prétraitement des cellules avec la fluorodésoxyuridine conduit à une diminution en thymidines phosphates endogènes et, par voie de conséquence, à une phosphorylation plus intense de la thymidine exogène en dTTP ^3H après la réversion de l'effet inhibiteur (WEIL - 166).

Dans toutes les expériences où nous avons fait appel à des inhibiteurs de la synthèse des protéines, le produit a été ajouté au milieu de culture trente minutes avant le transfert à température optimale ou supra-optimale de façon à éviter qu'une synthèse de protéines puisse se produire durant le temps de lavage précédant le transfert.

Nous avons utilisé des inhibiteurs de la synthèse protéique dont les modes d'action sont différents. La puromycine, qui possède une analogie structurale avec l'amino-acyl-adénosine terminale du RNA de transfert, se substitue à ce RNA, ce qui entraîne l'apparition de chaînes polypeptidiques incomplètes (167).

La fluorophénylalanine n'inhibe pas la synthèse des protéines, mais est incorporée dans les protéines qui dès lors ne sont plus fonctionnelles (168). Malgré leur mode d'action différent, les deux inhibiteurs bloquent totalement la synthèse du DNA viral.

La question qui se pose à présent, est de savoir quelles sont les protéines précoces dont le fonctionnement est affecté par les températures supra-optimales. On sait que parmi les différentes protéines synthétisées dans les cellules infectées avec les Poxvirus une ou plusieurs d'entre elles participent au processus de décapsidation des virions.

DALES (11) par la microscopie électronique et JOKLIK (169) par la mesure de l'incorporation de thymidine ^3H dans le précipité acido-insoluble de la fraction cytoplasmique des cellules infectées ont montré que la décapsidation s'effectue en deux étapes. Au cours de la première étape qui ne nécessite pas de synthèse de protéines, il se produit une digestion des enveloppes externes ; la deuxième étape est caractérisée par la libération de l'acide nucléique à partir de la nucléocapside.

Pour JOKLIK (27 - 114 - 115) une protéine inductrice libérée par le virion au cours de la première étape de la décapsidation déreprime le génome de la cellule ce qui aboutit à la synthèse de la "décapsidase". Des études récentes de KATES et MAC AUSLAN (117 - 170), MUNYON et KIT (171) et de WOODSON (116 - 172) ont montré que le génome des Poxvirus qui code pour les fonctions précoces pouvait être transcrit et conduire à une synthèse de RNA messenger précoce alors qu'il était encore enfermé dans la capsid. Ces auteurs expliquent cela par l'existence d'une RNA polymérase DNA dépendante faisant partie intégrante de la particule virale. Pour WOODSON (116) la protéine inductrice de JOKLIK et la RNA polymérase DNA dépendante ne sont qu'une seule et même protéine.

On peut ainsi imaginer soit que la RNA polymérase DNA dépendante ne fonctionne pas à 41°C, soit que la décapsidation est thermosensible.

James STEVENIN et Rémy PETER (communication personnelle) ont pu mettre en évidence une synthèse de mRNA précoce dans des cellules KB infectées avec le virus vaccinal et maintenues à 41°C. Cela démontre que la RNA polymérase DNA dépendante est fonctionnelle à 41°C et que l'évènement thermosensible porte sur une étape ultérieure. Différents arguments démontrent que le processus de décapsidation n'est pas affecté à température supra-optimale :

- la première moitié de la phase primaire n'est pas thermosensible
- si on inhibe la décapsidation des virions par la puromycine ajoutée dès le début de l'infection, les phénomènes de régulation n'ont plus lieu et à la place du pic de synthèse des messagers précoces on observe un plateau. Or, le pic de synthèse des mRNA précoces formés à 41°C se superpose à celui des messagers synthétisés à 36°C.
- la DNA polymérase qui n'est synthétisée que lorsque les virus sont décapsidés (116) est formée à température supra-optimale. Il convient de remarquer que dans ces expériences nous avons travaillé à 41°C dès l'infection afin d'éliminer la possibilité d'une synthèse d'enzymes durant la période d'adsorption.

L'infection des cellules en culture par des virus à DNA s'accompagne de la synthèse d'un certain nombre de protéines présentant une activité enzymatique. C'est le cas pour les virus du groupe Pox, les adénovirus et les virus herpétiques (KEIR - 173 ; KIT et DUBBS - 174).

Dans le cytoplasme des cellules KB infectées avec le virus vaccinal et incubées à 36°C nous avons mis en évidence une activité de la thymidine kinase très supérieure à celle notée dans les cellules non infectées. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus par MAGEE (175), MAC AUSLAN et JOKLIK (176), MAC AUSLAN (177 - 178), JUNGWIRTH et JOKLIK (149) et KIT et collaborateurs (179). Cette activité qui s'amorce une ou deux heures après l'infection atteint un plateau à la sixième heure. Dans les cellules infectées maintenues à 41°C l'activité de la thymidine kinase est moins élevée qu'à 36°C et la vitesse de synthèse de l'enzyme est moins rapide.

L'utilisation des cellules L (TK⁻) déficientes en thymidine kinase permet de confirmer que la thymidine kinase induite par le virus vaccinal est synthétisée à 41°C. En effet, l'incorporation de thymidine ³H dans la fraction nucléaire des cellules infectées incubées à 41°C montre que cette enzyme est formée et fonctionne à température supra-

optimale. Toutefois, nous avons remarqué que cette incorporation est plus faible que celle observée à 36°C. La méthode autoradiographique confirme ces résultats et montre que les noyaux des cellules L (TK⁻) infectées avec le virus vaccinal sont plus faiblement marqués quand les cultures sont incubées à 41°C.

La thymidine kinase est une enzyme "gratuite" en ce sens qu'elle n'est pas nécessaire à la replication du DNA viral. En effet, DUBBS et KIT (180), MUNYON et KIT (181) ont montré qu'un mutant viral (TK⁻) qui n'induit pas la formation de thymidine kinase se développe dans les cellules L (TK⁻) chez lesquelles l'enzyme fait également défaut. Par conséquent, même si cette enzyme était thermosensible, elle ne constituerait pas le facteur responsable de l'inhibition de la replication du DNA viral.

Nous avons montré que les thymidines kinases virale et cellulaire fonctionnent parfaitement bien quand la réaction est effectuée "in vitro" pendant trente minutes à 41°C. KIT et DUBBS (182) signalent que la thymidine kinase cellulaire à une demi durée de vie de vingt-neuf à quarante-trois minutes à 38°C alors que celle de la thymidine kinase virale est de trois cents minutes. En fait, le but de nos expériences n'était pas de rechercher une différence dans la thermo-inactivation des deux enzymes, mais de savoir si l'enzyme pouvait fonctionner à température supra-optimale "in vitro" et "in vivo".

En dehors des différences de thermo-inactivation entre les thymidines kinases virale et cellulaire soulignées également par MAC AUSLAN (178) pour le virus du cowpox et par RICCERI et collaborateurs (183) pour le virus du polyome, les enzymes diffèrent par leur propriétés immunologiques (KIT et DUBBS - 182). Cette observation semble pouvoir s'étendre à d'autres virus à DNA tels que le virus de l'herpès (KLEMPERER et collaborateurs - 184) et celui de la pseudorange (HAMADA et collaborateurs - 185). Ces données permettent de conclure que la thymidine kinase extraite des cellules infectées avec des virus à DNA est bien spécifique du virus.

Un certain nombre de travaux font état d'une augmentation importante de l'activité de la DNA polymérase dans les cellules infectées avec des virus à DNA ; celle-ci coïncide avec le début de la replication du DNA viral. Ceci a été observé pour les virus qui se développent dans le noyau, comme le virus de l'herpès (KEIR et GOLD - 186) et les adénovirus (GREEN et collaborateurs - 187 ; KIT et collaborateurs - 188 ; LEDINKO - 189 ; SHEEK - 190), ainsi que

pour les virus à multiplication cytoplasmique tels que les Pox virus (GREEN et PINA - 191 ; JUNGWIRTH et JOKLIK - 149 ; JOKLIK, JUNGWIRTH et collaborateurs - 192 ; MAGEE - 175) ou le virus 3 de la grenouille FV₃ (MAC AUSLAN et KUCHERA - 193).

Les arguments permettant de trancher en faveur d'une spécificité virale de l'enzyme ont été discutés par GREEN (194).

En ce qui concerne le virus de la vaccine, JUNGWIRTH et JOKLIK (149) ont montré que la DNA polymérase des cellules infectées possède des propriétés différentes de celle des cellules non infectées, en particulier, les concentrations saturantes en "primer" et les pH d'action optimum sont différents. D'autre part, MAGEE et MILLER (157, 195) ont mis en évidence une différence antigénique entre l'enzyme présente dans le cytoplasme des cellules infectées et celle extraite du noyau des cellules non infectées.

A température optimale, la cinétique de la synthèse de la DNA polymérase dans la fraction cytoplasmique des cellules KB infectées avec le mutant "froid" du virus vaccinal est tout à fait comparable à celle décrite par d'autres auteurs (JUNGWIRTH et JOKLIK - 149) qui ont utilisé des systèmes cellulaires différents.

A 41°C il existe indéniablement une activité enzymatique ; celle-ci est cependant un peu moins élevée qu'à 36°C. JUNGWIRTH et JOKLIK (149) ont montré que le plateau qui est atteint à la quatrième heure et qui représente une inhibition de la synthèse de l'enzyme est en rapport avec un mécanisme régulateur qui est sous le contrôle du génome néoformé.

Dans les cellules KB incubées à 41°C, il n'y a pas de replication du DNA viral ; on pouvait donc s'attendre à une synthèse non contrôlée de l'enzyme comme cela est observé lorsque la replication du DNA est inhibée par la fluorodésoxyuridine. On constate au contraire une perte considérable de l'activité enzymatique à partir de la troisième heure après l'infection.

Les causes de cette baisse d'activité ne sont pas encore établies, mais on peut d'ores et déjà exclure une thermosensibilité de la DNA polymérase virale du moins "in vitro", étant donné qu'à 41°C la réaction est stimulée et qu'une préincubation de trente minutes à température élevée n'a aucun effet sur l'activité de l'enzyme.

Il est intéressant de rapprocher nos résultats de ceux obtenus par KAMIYA et collaborateurs (196) qui ont montré que dans des cellules de rein de lapin infectées avec le virus de la pseudorage du porc,

l'activité des enzymes impliquées dans la replication du DNA viral baisse considérablement à partir de la dixième heure après l'infection. Ces auteurs attribuent cette baisse d'activité à une fuite des enzymes associée à une perte de composants cellulaires. Des protéines spécifiques qui sont synthétisées par les cellules infectées entre la quatrième et la septième heure seraient responsables de cette fuite d'enzymes de la cellule.

Pour notre part, dans le cas du virus vaccinal, nous n'avons pas pu mettre en évidence de fuite de protéines dans des cellules infectées incubées à 41°C (résultats non publiés).

Quelles que soient les causes de cette perte d'activité de l'enzyme, les résultats que nous avons obtenus démontrent que la DNA polymérase est synthétisée dans des cellules KB infectées avec le virus vaccinal et maintenues à 41°C. L'enzyme, d'autre part, fonctionne parfaitement bien à cette même température "in vitro". On peut donc conclure que ce n'est pas une thermosensibilité de la DNA polymérase qui est responsable de l'inhibition de la replication du DNA viral à 41°C.

Nos résultats s'opposent à ceux de BEDSON et CRUICKSHANK (197) à propos du virus de la variole dont la replication du DNA est inhibée à 40°C. En effet, ces auteurs ont montré que l'activité de la DNA polymérase augmente de cinq à six fois dans les cellules HeLa infectées et incubées à 35°C alors qu'à 40°C il n'y a aucune activité DNA polymérasique. L'enzyme extraite des cellules infectées à 35°C est instable à 40°C "in vitro" alors qu'à 35°C elle est très stable.

L'infection virale provoque l'induction de la synthèse de désoxyribonucléases, aussi bien dans les cellules bactériennes que dans les cellules animales (OLESON et KOERNER - 198 ; PRICER et WEISSBACH - 199 ; TRILLING et APOSHIAN - 200 ; MAC AUSLAN - 201 ; MAC AUSLAN et collaborateurs - 202 ; JUNGWIRTH et JOKLIK - 149).

Dans le cas d'une infection provoquée par le virus vaccinal, ERON et MAC AUSLAN (203) ont mis en évidence trois désoxyribonucléases qui se distinguent entre elles par leur affinité pour le substrat et leur pH d'activité :

- une DNase alcaline qui agit sur le DNA bicaténaire,
- une DNase neutre qui agit sur le DNA monocaténaire,
- une DNase acide qui agit sur le DNA monocaténaire.

Les DNases acide et alcaline sont considérées comme des exonucléases.

On ne sait pas à quel moment de la replication du DNA ces désoxyribonucléases interviennent. LEHMAN (204) a envisagé la possibilité d'un rôle de ces enzymes dans la synthèse du DNA : en effet, chez le phage

λ il existe des mutants déficients en exonucléase. Cette mutation porte sur le cistron N du génome du phage et entraîne une absence de synthèse du DNA du phage. Ces résultats indiquent que ces enzymes interviennent précocément dans l'infection, mais ne permettent pas de préciser leur rôle.

Les résultats de nos expériences montrent qu'à 36°C l'activité de la DNase neutre augmente très rapidement après le début de l'infection, comme l'avaient déjà signalé JUNGWIRTH et JOKLIK (149) ainsi que MAC AUSLAN et collaborateurs (202).

A 41°C par contre nos résultats sont difficiles à interpréter. Bien qu'il existe indéniablement une augmentation de l'activité enzymatique, celle-ci est dans quelques expériences superposable, dans d'autres expérience inférieure à celle mesurée à 36°C.

Pour ce qui est de la DNase basique, nos résultats diffèrent sensiblement de ceux des auteurs précités. En effet, dans les conditions dans lesquelles nous nous sommes placés, l'activité nucléasique n'apparaît qu'à la quatrième heure après l'infection à 36°C. A 41°C il ne semble y avoir aucune activité de la DNase basique. Ce dernier résultat est certes intéressant, mais il ne permet pas d'expliquer l'inhibition de la replication du DNA viral à température supra-optimale. En effet, l'activité de la DNase basique n'augmente qu'à la quatrième heure après l'infection quand la replication du DNA viral est pratiquement achevée et, de ce fait, on ne comprend pas très bien le rôle qu'elle pourrait jouer dans la synthèse du DNA. Cependant on ne peut pas exclure que les techniques que nous avons utilisées n'étaient pas suffisamment sensibles pour détecter une activité plus précoce. Ce point mérite une étude plus approfondie.

En ce qui concerne l'activité de la DNase neutre, la diminution de son activité observée dans la plupart des expériences ne semble pas suffisante pour être rendue responsable de l'inhibition de la replication du DNA viral à 41°C. Quoi qu'il en soit, le rôle des DNases dans la replication du DNA du virus vaccinal n'est pas encore élucidé. Des recherches ultérieures portant sur la thermosensibilité des DNases et faisant appel à des techniques plus fines avec des préparations purifiées permettront peut-être d'apporter quelques éclaircissements sur l'utilité de ces enzymes dans la multiplication du virus vaccinal.

MAC AUSLAN et KATES (151) ont montré que la DNase acide se présente sous deux formes : une forme soluble apparaissant entre la troisième et la huitième heure dans la fraction cytoplasmique des cellules infectées et une forme liée qui n'est pas détectable avant la sixième heure. La forme soluble constitue le précurseur de la forme liée. Celle-ci peut être libérée des structures membranaires auxquelles elle est liée par un traitement au désoxycholate de sodium. La synthèse de cette enzyme peut être considérée comme une fonction virale tardive (MAC AUSLAN et KATES - 151, 205). La DNase acide est codée par le DNA néoformé et sa concentration dans le cytoplasme est directement proportionnelle à la quantité de DNA néoformé. Lorsque la replication du DNA est inhibée par la fluoro-désoxyuridine, les enzymes précoces ne sont plus soumis à un mécanisme de contrôle (switch off) et leurs synthèses s'effectuent de façon anarchique au delà de la sixième heure. Dans ces conditions, la DNase acide n'est pas formée. Les résultats que nous avons obtenus tant à température optimale que supra-optimale confirment ceux de MAC AUSLAN et KATES. A 41°C il n'y a aucune synthèse de DNase acide étant donné que la replication du DNA est inhibée.

Les résultats de nos expériences montrent que la replication du DNA viral d'une part, qu'un ou plusieurs événements de la phase secondaire d'autre part, sont thermosensibles et sont responsables de l'inhibition du développement du mutant "froid" à 41°C. En ce qui concerne l'inhibition de la replication du DNA viral à température supra-optimale dont l'étude a fait l'objet de la deuxième partie de notre travail, nous avons démontré qu'il fallait l'attribuer à la thermosensibilité de la synthèse ou du fonctionnement d'une ou de plusieurs protéines précoces. Parmi ces protéines on peut exclure la "décapsidase", la thymidine kinase et la DNA polymérase. Pour ce qui est des DNases, leur rôle dans l'infection virale n'est pas clair et dans l'état actuel de nos connaissances nous ne pouvons que constater la thermosensibilité de la synthèse de la DNase basique.

Les travaux de KATES et MAC AUSLAN (152) ont montré qu'une ou plusieurs autres protéines différentes de la thymidine kinase et de la DNA polymérase sont impliquées dans la synthèse du DNA du virus vaccinal. La synthèse de ces protéines apparaît comme une fonction précoce au cours de l'infection virale ; en effet, ces protéines peuvent s'accumuler lorsque la replication du DNA est bloquée. Elles sont stables et peuvent fonctionner durant plusieurs heures après que leur

synthèse ait été inhibée par de la puromycine et contrairement à la thymidine kinase et la DNA polymérase (JUNGWIRTH et JOKLIK - 149), elles ont un messenger de courte durée de vie.

Le rôle de ces protéines ne semble plus pouvoir être mis en doute. Dans un récent travail portant sur la dissociation des fonctions du virus vaccinal par inactivation aux rayons γ , Christian DECKER (communication personnelle) a montré que la cible radiosensible de la DNA polymérase représente un tiers du génome responsable de la replication du DNA viral. Ces résultats suggèrent que d'autres protéines interviennent dans la replication du DNA du virus vaccinal. Si leur poids moléculaire était sensiblement le même que celui de la DNA polymérase, ces protéines seraient au nombre de deux.

On ne connaît pas actuellement la nature de ces protéines. Il peut s'agir des DNases, mais on peut également imaginer le rôle d'une protéine de type polynucléotide-ligase comme c'est le cas chez le bactériophage T4 (206). Chez les mutants thermosensibles où le gène codant pour cette ligase a muté, il n'y a pas de replication du DNA.

Si une telle enzyme est nécessaire dans l'infection vaccinale sa thermosensibilité ne peut pas être exclue en tant que mécanisme responsable de l'inhibition du développement du virus vaccinal à température supra-optimale.

x
x x

R E S U M E E T C O N C L U S I O N S



Au cours du travail qui fait l'objet de cette thèse nous avons étudié l'influence de la température sur le développement du virus de la vaccine.

La première partie des recherches exposées est consacrée à l'étude de la thermosensibilité du développement viral et à la corrélation entre thermorésistance et virulence. Dans la seconde partie nous nous efforçons d'analyser les mécanismes responsables de l'inhibition de la replication du DNA viral à température supra-optimale.

I. THERMOSENSIBILITE DU DEVELOPPEMENT DU VIRUS VACCINAL.

- Le développement, sur cellules KB, des souches VaMe et WR du virus vaccinal est inhibé par les températures supra et infra-optimales.
- Par des passages successifs à des températures régulièrement décroissantes ou croissantes, nous avons sélectionné des mutants thermosensibles et des mutants thermorésistants. Ces souches ont été caractérisées d'une part par leur aptitude à se développer à différentes températures, d'autre part par leur pouvoir pathogène.
 - les mutants "froids" sont plus sensibles à l'effet de températures élevées que les mutants "chauds" ; aux températures infra-optimales, c'est le phénomène inverse qu'on observe. En traçant les courbes de sensibilité du développement à la température des différents mutants obtenus, on constate que les conclusions de LWOFF pour le poliovirus se vérifient dans le cas du virus de la vaccine : la diminution de la thermorésistance s'accompagne d'une diminution de la psychrosensibilité et vice et versa.
 - En ce qui concerne le pouvoir pathogène, nous avons démontré que les mutants "froids" ont perdu leur virulence pour les animaux de laboratoire alors que les mutants "chauds" possèdent au contraire une virulence accrue. Il existe une corrélation entre thermorésistance du développement et virulence.

Nous nous sommes ensuite demandé si toutes les étapes qui mènent à la formation des virions sont thermosensibles ou si une partie seulement du cycle de développement est inhibée par les températures élevées.

Au cours d'expériences où nous avons fait agir les températures élevées (41°C) soit sur la phase primaire, soit sur la phase secondaire du cycle de développement du mutant "froid" de la souche VaMe, nous avons montré que c'est la seconde moitié de la phase primaire et la totalité de la phase secondaire qui sont sensibles à l'effet des températures supra-optimales. Ces résultats démontrent qu'il existe deux évènements thermosensibles, l'un portant sur la phase primaire du cycle de développement, le second portant sur la phase secondaire. La thermosensibilité de la phase secondaire a été confirmée par une étude au microscope électronique : dans des cellules transférées à 41°C après trois ou quatre heures trente d'infection à 36°C, on n'observe aucune évolution conduisant à la maturation des virions.

II. ETUDE DE L'INHIBITION DE LA REPLICATION DU DNA VIRAL D'UN MUTANT "FROID" A TEMPERATURE SUPRA-OPTIMALE.

On sait que la replication du DNA viral a lieu pour sa totalité durant la phase primaire. Des études autoradiographiques et biochimiques effectuées à 36 et à 41°C ont montré qu'à température supra-optimale la replication du DNA du mutant "froid" du virus de la vaccine est complètement bloquée.

D'autre part, nous avons constaté que le DNA viral synthétisé à 36°C est dégradé quand on transfère les cellules à température supra-optimale ; cette dégradation n'est pas due à une nouvelle synthèse de protéines à activité nucléasique.

Nous nous sommes alors demandé dans quelle mesure les protéines précoces impliquées dans la synthèse du DNA viral pouvaient être responsables de cette inhibition.

- Dans le cas d'un transfert de 41 à 36°C une nouvelle synthèse de protéines est nécessaire pour conduire à la synthèse de DNA viral.
- Une ou plusieurs protéines synthétisées à 36°C (en présence de FUDR) sont inactivées à température supra-optimale.

Nous avons ensuite cherché à savoir quelles sont les enzymes thermosensibles. Différents arguments en faveur d'un fonctionnement normal des mécanismes de la décapsidation à 41°C ayant pu être

avancés, nous avons effectué une étude comparée à 36 et à 41°C de la synthèse et du fonctionnement des différentes enzymes participant à la replication du DNA viral.

. Thymidine kinase.

Dans des cellules infectées et maintenues à 41°C on trouve une activité de la thymidine kinase un peu plus faible que celle trouvée dans des cellules infectées à 36°C. La thymidine kinase fonctionne parfaitement bien à 41°C "in vitro" et "in vivo" (étude sur un système cellulaire déficient en thymidine kinase).

. DNA polymérase.

Dans des cellules infectées et maintenues à 41°C l'activité de la DNA polymérase augmente jusqu'à la troisième ou la quatrième heure. On observe ensuite une diminution importante de l'activité enzymatique. La DNA polymérase fonctionne parfaitement bien à 41°C "in vitro"; une préincubation de l'enzyme à 41°C pendant trente minutes n'a aucune influence sur son fonctionnement à température optimale.

. Désoxyribonucléases.

La DNase neutre codée par le génome parental est synthétisée dans les cellules infectées maintenues à 41°C. Par contre, la DNase basique qui est également codée par le génome parental n'a pas pu être décelée à température supra-optimale.

La DNase acide qui est codée par le génome fils fait défaut à 41°C.

Ces résultats nous amènent à conclure que l'inhibition du développement du mutant "froid" du virus vaccinal à température supra-optimale est due au blocage des mécanismes de replication du DNA viral. Ce blocage peut s'expliquer par la thermosensibilité de la synthèse ou du fonctionnement d'une ou plusieurs protéines précoces différentes de la "décapsidase", de la thymidine kinase et de la DNA polymérase. Nos conclusions rejoignent celles de KATES et MAC AUSLAN qui ont montré que des protéines autres que la thymidine kinase et la DNA polymérase sont nécessaires pour assurer la replication du DNA du virus vaccinal. Il n'existe pour le moment aucun argument expérimental permettant d'affirmer que ces protéines correspondent aux DNases virales.



S U M M A R Y



In this thesis the influence of temperature on the development of vaccinia virus has been studied.

In the first part of this work we investigate the thermosensitivity of viral development as well as the relationship between thermoresistance and virulence. In the second part, we propose to determine the mechanisms responsible for the inhibition of viral DNA synthesis at supra-optimal temperatures.

I. THERMOSENSITIVITY OF THE DEVELOPMENT OF VACCINIA VIRUS.

- The development of the VaMe and WR strains of vaccinia virus was inhibited by supra and infra-optimal temperatures on KB cells.
- After repeated passages at steadily decreasing or increasing temperatures, we selected thermosensitive and thermoresistant mutants. Those strains were characterised first by their ability to develop at various temperatures, secondly by their pathogenicity.

- . " Cold" mutants were more sensitive to high temperatures than "warm" mutants ; at infra-optimal temperatures it was the reverse.

The curves illustrating the sensitivity to temperature of the development of those mutants showed that LWOFF's conclusions about poliovirus could be applied to vaccinia virus : a decrease in their thermoresistance was found simultaneously with a decrease in their psychrosensitivity and conversely.

- . As to their pathogenicity, we proved that "cold" mutants were no longer virulent for laboratory animals, while the virulence of "warm" mutants was increased. There is a definite relationship between the thermoresistance of virus development and virulence.

We then attempted to determine whether all the events of virion formation were thermosensitive, or whether one step only in the growth cycle was inhibited by high temperatures. Experiments where incubation temperatures were increased (41°C) either during the primary phase, or during the secondary phase of the growth cycle of the VaMe "cold" mutant, showed that it was the second half of the primary phase, and the whole of the secondary phase which were sensitive to supra-optimal temperatures.

Such results seem to stress that two thermosensitive events are to be found :

one in the primary phase of the growth cycle, the other during the secondary phase.

A direct evidence of the thermosensitivity of the secondary phase was given by electromicroscopic study : in cells transferred to 41°C after three to four and a half hours infection at 36°C, none of the structures involved in the maturation process could be noticed.

II. STUDY OF THE INHIBITION OF VIRAL DNA REPLICATION OF A "COLD" MUTANT AT A SUPRA-OPTIMAL TEMPERATURE.

It is well known that the whole of viral DNA replication process takes place during the primary phase. Autoradiographic and biochemical studies at 36°C and 41°C showed that a supra-optimal temperature completely inhibit viral DNA replication of the "cold" mutant of vaccinia virus.

On the other hand, we observed that viral DNA, synthesized at 36°C, was degraded when the cells were transferred to a supra-optimal temperature ; such a degradation was not due to a new protein synthesis.

We then wondered how far the early proteins involved in the synthesis of viral DNA might be responsible for such a block.

- When infected cells were transferred from 41 to 36°C, a new synthesis of proteins was required for viral DNA synthesis.
- One or more proteins synthesized at 36°C (in the presence of FUDR) were inactivated at supra-optimal temperature.

We then tried to determine which were the thermosensitive enzymes. After various arguments concerning the fact that a normal uncoating occurs at 41°C had been proposed, we then studied both at 36 and 41°C the synthesis and the activity of the various enzymes involved in the replication of viral DNA.

Thymidine kinase.

In infected cells kept at 41°C, the activity of thymidine kinase was found to be slightly lower than that observed in those infected at 36°C. The thymidine kinase was quite active at 41°C "in vitro" and

"in vivo" (an experiment was carried out on cells deficient in thymidine kinase).

. DNA polymerase.

In infected cells kept at 41°C the activity of DNA polymerase increased until the third or the fourth hour. After that, an important decrease in this activity was noticed. DNA polymerase acted normally at 41°C "in vitro" ; a preincubation of this enzyme at 41°C for thirty minutes had no influence whatever on its activity at optimal temperature.

. Desoxyribonucleases.

Neutral DNase coded for by the parental genome was synthesized in infected cells kept at 41°C. Alkaline DNase however, also coded for by the parental genome, was not to be found at a supra-optimal temperature.

Acid DNase transcribed from the progeny DNA was missing at 41°C.

These results lead us to conclude that the inhibition of the development of the "cold" mutant of vaccinia virus at supra-optimal temperatures is due to a block in the viral DNA replication mechanism. This block can be accounted for by the thermosensitivity either of the synthesis, or of the activity of one or several early proteins other than uncoating protein, thymidine kinase and DNA polymerase. Our data are in agreement with those of KATES and MAC AUSLAN, who showed that thymidine kinase and DNA polymerase are not the only proteins requisite for vaccinia virus DNA replication. No experimental evidence, so far, allows us to think that those proteins are the viral DNase.

x

x x



R E F E R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

(par ordre d'arrivée dans le texte)



- 1 LWOFF A. - Factors influencing the evolution of viral diseases at the cellular level and in the organism.
Bact. Reviews - 1959 - 23 - 109-124.
- 2 LWOFF A. - Mutations affecting neurovirulence .
In "Poliomyelitis" - 5th Congr. Inter. Poliomyelitis (Lippincott, Copenhagen 1961) - ed. 13-20.
- 3 LWOFF A. et LWOFF M. - Sur les facteurs du développement viral et leur rôle dans l'évolution de l'infection.
Ann. Inst. Past. - 1960 - 98 - 173-203.
- 4 LWOFF A. et LWOFF M. - Remarques méthodologiques à propos de la thermosensibilité du développement viral.
Ann. Inst. Past. - 1961 - 101 - 313-317.
- 5 LWOFF A. et LWOFF M. - Les évènements cycliques du cycle viral.
I. Effets de la température.
Ann. Inst. Past. - 1961 - 101 - 469-477.
- 6 BURNET F.M. and LUSH D. - The propagation of the virus of infectious ectromelia of mice in the developing egg.
J. Path. Bact. - 1936 - 43 - 105-120.
- 7 ENDERS J.F. and PEARSON H.E. - Resistance of chicks to infection with influenza A virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1941 - 48 - 143-146.
- 8 THOMPSON R.L. and COATES M.S. - The effect of temperature upon the growth and survival of myxoma, herpes, and vaccinia virus in tissue culture.
J. infect. Dis. - 1942 - 71 - 83-85.
- 9 BEDSON H.S. and DUMBELL K.R. - The effect of temperature on the growth of pox viruses in the chick embryo.
J. Hyg. - 1961 - 59 - 457-469.
- 10 " MÜLLER D. und PETERS D. - Substrukturen des Vaccinevirus, dargestellt durch Negativkontrastierung.
Arch. Ges. Virusforsch. - 1963 - 13 - 435-451.

- 11 DALES S. - The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid.
J. Cell. Biol. - 1963 - 18 - 51-72.
- 12 WESTWOOD J.C.N., HARRIS W.J., ZWARTOUW H.T., TITMUSS D.H. and APPLEYARD G. - Studies on the structure of vaccinia virus.
J. Gen. Microbiol. - 1964 - 34 - 67-78.
- 13 EASTERBROOK K.B. - Controlled degradation of vaccinia virions in vitro : an electron microscopy study.
J. Ultrastruct. Res. - 1966 - 14 - 484-496.
- 14 HOAGLAND C.L., SMADEL J.E. and RIVERS T.M. - Constituents of elementary bodies of vaccinia. I. Certain basic analyses and observations on lipid components of the virus.
J. Exp. Med. - 1940 - 71 - 737-750.
- 15 HOAGLAND C.L., LAVIN G.I., SMADEL J.E. and RIVERS T.M. - Constituents of elementary bodies of vaccinia. II. Properties of nucleic acid obtained from vaccinia virus.
J. Exp. Med. - 1940 - 72 - 139-147.
- 16 HOAGLAND C.L., WARD S.M., SMADEL J.E. and RIVERS T.M. - Constituents of elementary bodies of vaccinia. IV. Demonstration of copper in the purified virus.
J. Exp. Med. - 1941 - 74 - 69-80.
- 17 HOAGLAND C.L., SMADEL J.E., WARD S.M. and RIVERS T.M. - Constituents of elementary bodies of vaccinia. V. A flavin associated with the purified virus.
J. Exp. Med. - 1941 - 74 - 133-144.
- 18 HOAGLAND C.L., WARD S.M., SMADEL J.E. and RIVERS T.M. - Constituents of elementary bodies of vaccinia. VI. Studies on the nature of enzymes associated with the purified virus.
J. Exp. Med. - 1942 - 76 - 163-173.
- 19 SMADEL J.E., LAVIN G.I. and DUBOS R.J. - Some constituents of elementary bodies of vaccinia virus.
J. Exp. Med. - 1940 - 71 - 373-389.

- 20 JOKLIK W.K. - The purification of four strains of poxvirus.
Virology - 1962 - 18 - 9-18.
- 21 ZWARTOUW H. T. - The chemical composition of vaccinia virus.
J. Gen. Microbiol. - 1964 - 34 - 115-123.
- 22 SMADEL J.E. , RIVERS T.M. and PICKELS E.G. - Estimation of the
purity of preparations of elementary bodies.
J. Exp. Med. - 1939 - 70 - 379-385.
- 23 ALLISON A.C. and BURKE D.C. - The nucleic acid contents of viruses.
J. Gen. Microbiol. - 1962 - 27 - 181-194.
- 24 HYDE J.M. , GAFFORD L.G. and RANDALL C.C. - Fine structure of
the coat and nucleoid material of fowlpox virus.
J. Bacteriol. - 1965 - 89 - 1557-1569.
- 25 PFAU C.J. and MAC CREA J.F. - Release of deoxyribonucleic acid
from vaccinia virus by mercaptoethanol and pronase.
Nature - 1962 - 194 - 894-895.
- 26 JOKLIK W.K. - Some properties of poxvirus DNA.
J. Mol. Biol. - 1962 - 5 - 265-274.
- 27 JOKLIK W.K. - The poxviruses.
Bact. Rev. - 1966 - 30 - 33-66.
- 28 HOLOWCZAK J.A. and JOKLIK W.K. - Studies on the structural proteins
of vaccinia virus. I. Structural proteins of virions and cores.
Virology - 1967 - 33 - 717-725.
- 29 HOLOWCZAK J.A. and JOKLIK W.K. - Studies on the structural proteins
of vaccinia virus. II. Kinetics of the synthesis of individual groups of
structural proteins.
Virology - 1967 - 33 - 726-739.
- 30 ZWARTOUW H. T. , WESTWOOD J.C.N. and HARRIS W.J. - Antigens
from vaccinia virus particles.
J. Gen. Microbiol. - 1965 - 38 - 39-45.

- 31 MARQUARDT J., HOLM S.E. and LYCKE E. - Immunoprecipitating factors of vaccinia virus.
Virology - 1965 - 27 - 170-178.
- 32 WOODROOFE G.M. and FENNER F. - Serological relationships within the poxvirus group : an antigen common to all members of the group.
Virology - 1962 - 16 - 334-341.
- 33 APLEYARD G. and WESTWOOD J.C.N. - The growth of rabbitpox virus in tissue culture.
J. Gen. Microbiol. - 1964 - 37 - 391-401.
- 34 WESTWOOD J.C.N., ZWARTOUW H.T., APLEYARD G. and TITMUS D.H.J. - Comparison of the soluble antigens and virus particle antigens of vaccinia virus.
J. Gen. Microbiol. - 1965 - 38 - 47-53.
- 35 APLEYARD G., ZWARTOUW H.T. and WESTWOOD J.C.N. - A protective antigen from the poxviruses. I. Reaction with neutralizing antibody.
Brit. J. Exp. Pathol. - 1964 - 45 - 150-161.
- 36 APLEYARD G. and WESTWOOD J.C.N. - A protective antigen from the poxviruses. II. Immunization of animals.
Brit. J. Exp. Pathol. - 1964 - 45 - 162-173.
- 37 SHEDLOVSKY T. and SMADEL J.E. - The LS - antigen of vaccinia. II. Isolation of a single substance containing both L and S activity.
J. Exp. Med. - 1942 - 75 - 165-178.
- 38 FENNER F. - The biological characters of several strains of vaccinia, cowpox and rabbitpox viruses.
Virology - 1958 - 5 - 502-529.
- 39 EAGLE H. - Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1955 - 89 - 362-364.
- 40 KIT S., DUBBS D.R., PIEKARSKI L.J. and HSU T.C. - Deletion of thymidine kinase activity from L cells resistant to bromodeoxyuridine.
Exp. Cell. Res. - 1963 - 31 - 297-312.

- 41 EAGLE H. - Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture.
Science - 1955 - 122 - 501-504.
- 42 EARLE R. - Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibro-
blasts cultures and changes seen in the living cells.
J. Natl. Cancer Inst. - 1943 - 4 - 165-212.
- 43 KIRN A. et BRAUNWALD J. - Titrage du virus vaccinal par la méthode
des plages sur souche cellulaire KB. I. Exposé de la méthode.
Ann. Inst. Past. - 1962 - 103 - 832-840.
- 44 KIRN A. et BRAUNWALD J. - Titrage du virus vaccinal par la méthode
des plages sur souche cellulaire KB. II. Critères de fidélité et de
reproductibilité de la méthode.
Ann. Inst. Past. - 1963 - 104 - 49-54.
- 45 REED L. J. and MUENCH H. - A simple method of estimating fifty per
cent endpoints.
Am. J. Hyg. - 1938 - 27 - 493-497.
- 46 GORDON G. B., MILLER L. R. and BENSCH K. G. - Fixation of tissue
culture cells for ultra structural cytochemistry.
Exp. Cell. Res. - 1963 - 31 - 440-443.
- 47 MILLONIG G. - Advantage of a phosphate buffer for O_5O_4 solutions
in fixation.
J. appl. Phys. - 1961 - 32 - 1637.
- 48 LUFT J. H. - Improvements in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol. - 1961 - 9 - 409-414.
- 49 REYNOLDS E. S. - The use of lead citrate at high pH as an electron
opaque strain in electron microscopy.
J. Cell. Biol. - 1963 - 17 - 208-212.
- 50 GROMAN N., LWOFF A. et LWOFF M. - Recherches sur un variant
dit "froid" du virus de la poliomyélite.
Ann. Inst. Past. - 1960 - 98 - 351-359.
- 51 ARMSTRONG C. and LILLIE R. D. - Vaccinia virus pneumonia in rabbits.
Public Health Rep. - 1929 - 44 - 2635-2647.

- 52 LWOFF A., ROIZMAN B. et LWOFF M. - Définition d'un évènement critique thermosensible dans le cycle du poliovirus.
C.R. Acad. Sci. - 1962 - 254 - 2462-2464.
- 53 LWOFF A. - The thermosensitive critical event of the viral cycle.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology - 1962 - 27 - 159-172.
- 54 SALZMAN N.P. - The rate of formation of vaccinia deoxyribonucleic acid and vaccinia virus.
Virology - 1960 - 10 - 150-152.
- 55 BRIODY B.A. and STANNARD C. - Studies on vaccinia virus. I. The development of haemagglutinating and infective particles in the chorio-allantois of the chick embryo.
J. Immunol - 1951 - 67 - 403-411.
- 56 ANDERSON S.G. - The growth curve of vaccinia virus on the chorio-allantois.
Australian J. Exp. Biol. Med. Sci. - 1954 - 32 - 633-640.
- 57 MAITLAND H.B. and TOBIN B.M. - The growth of vaccinia virus in the chorioallantois of the developing chick embryo and the production of complement-fixing antigen and haemagglutinin.
J. Hyg. - 1956 - 54 - 102-113.
- 58 CRAWFORD G.N.C. and SANDERS F.K. - The multiplication of vaccinia virus in tissue cultures of adult rabbit skin.
Quart. J. Microbiol. Sci. - 1952 - 93 - 119-132.
- 59 MAITLAND H.B. and MAGRATH D.I. - The growth "in vitro" of vaccinia virus in chick embryo chorioallantoic membrane, minced embryo and cell suspensions.
J. Hyg. - 1957 - 55 - 347-360.
- 60 OVERMAN J.R. and TAMM I. - Multiplication of vaccinia virus in the chorioallantoic membrane "in vitro".
Virology - 1957 - 3 - 173-184.
- 61 FURNESS G. and YOUNGNER J.S. - One-step growth curves for vaccinia virus in cultures of monkey kidney cells.
Virology - 1959 - 9 - 386-395.

- 62 SMITH K.O. and SHARP D.G. - Interaction of virus with cells in tissue culture . I. Adsorption on and growth of vaccinia virus in L Cells.
Virology - 1960 - 11 - 519-532.
- 63 EASTERBROOK K.B. - The multiplication of vaccinia virus in suspended KB cells.
Virology - 1961 - 15 - 404-416.
- 64 SIGURDSSON B. - The influence of age of host and temperature of incubation on infection of the chick embryo with vesicular stomatitis virus.
J. Exp. Med. - 1943 - 78 - 17-26.
- 65 SAMAILLE J. et WAROCQUIER R. - Influence des températures supra-optimales sur le cycle de multiplication de l'adénovirus 5.
Ann. Inst. Past. - 1966 - 110 - 244-251.
- 66 GEVAUDAN P. - Thermo-sélection et virulence comparée de mutants de virus coxsackie.
Thèse de Doctorat ès-Sciences - Aix - Marseille - 1968 .
- 67 LAB M. - Recherche d'une corrélation entre le mode d'action de l'interféron, la thermosensibilité du développement viral et la température.
Thèse de Doctorat en Médecine - Strasbourg - 1967.
- 68 STEVENS J.G. and JACKSON N.L. - Studies on a temperature-sensitive step essential to herpesvirus DNA replication.
Virology - 1967 - 32 - 654-661.
- 69 CRUICKSHANK J.G. and BEDSON H.S. - Temperature-sensitive events in the growth of variola virus in HeLa cells.
J. Gen. Virol. - 1968 - 3 - 255-266.
- 70 LEBEURIER G. - Remarques sur l'influence de la température sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac en cultures de tissus.
C.R. Acad. Sci. - 1959 - 249 - 795-797.
- 71 LEBEURIER G. - Action des températures supra et infra-optimales sur la multiplication du VMT dans des disques de feuilles de tabac immergés.
Etude du développement viral.
C.R. Acad. Sci. - 1964 - 258 - 6579-6582.

- 72 LEBEURIER G. - Action de la température sur le développement de diverses souches du virus de la mosaïque du tabac.
Thèse de Doctorat ès-Sciences - Strasbourg - 1966.
- 73 LEBEURIER G. et HIRTH L. - Propriétés comparées de deux souches de virus de la mosaïque du tabac différant par leur thermosensibilité.
Bull. de la Soc. Chim. Biol. - 1965 - 47 - 1653-1665.
- 74 LEBEURIER G. and HIRTH L. - Effect of elevated temperatures on the development of two strains of tobacco mosaic virus.
Virology - 1966 - 29 - 385-395.
- 75 BOUDREAULT A. et PAVILANIS V. - Evolution de quelques propriétés biologiques de quatre souches grippales lors de passages successifs à 29°C et à 41°C : Recherche de mutants froids.
Rev. Can. Biol. - 1964 - 23 - 253-260.
- 76 BEAUTEMS R. - Etude du développement du virus sindbis et de son mutant chaud à températures optimale et supra-optimale.
Influence de la température sur l'induction de la production d'interféron "in vitro" et "in vivo".
Thèse de Doctorat en Médecine - Strasbourg - 1968.
- 77 LAB M. et KIRN A. - Variations de la thermosensibilité du développement du virus sindbis en fonction du système cellulaire.
C.R. Acad. Sci. - 1969 - sous presse.
- 78 MICHEL J.B. - Recherche d'une corrélation entre le caractère "chaud" ou "froid" des mutants du virus de la vaccine et du virus sindbis et leur résistance à l'inactivation par la chaleur et par les rayons gamma.
Thèse de Doctorat en Médecine - Strasbourg - 1968.
- 79 LWOFF A. et LWOFF M. - Les événements cycliques du cycle viral.
III. Discussion.
Ann. Inst. Past. - 1961 - 101 - 490-504.
- 80 LWOFF A. et LWOFF M. - Les événements cycliques et molécules métastables.
J. Théoret. Biol. - 1962 - 2 - 48-62.

- 81 GROMAN N. B. - Temperature and the reproduction of Lambda-phage mutants.
J. Bactériol. - 1962 - 84 - 438-445.
- 82 LEBEURIER G. et HIRTH L. - Isolement et propriétés d'une souche mutante du virus de la mosaïque du tabac se multipliant aux températures supra-optimales.
C.R. Acad. Sci. - 1965 - 260 - 2353-2356.
- 83 LWOFF A. et LWOFF M. - Remarques sur quelques caractères du développement du virus de la poliomyélite.
C. R. Acad. Sci. - 1959 - 248 - 1725-1727.
- 84 DUBES G.R. and CHAPIN M. - Cold adapted genetic variants of polioviruses.
Science - 1956 - 124 - 586-588.
- 85 DUBES G.R. and WENNER H.A. - Virulence of poliovirus in relation to variant characteristics distinguishables on cells in vitro.
Virology - 1957 - 4 - 275-296.
- 86 SABIN A. and LWOFF A. - Relation between reproductive capacity of polioviruses at different temperatures in tissue culture and neurovirulence.
Proc. Natl. Acad. Sci. - 1959 - 45.
- 87 LWOFF A., TOURNIER P., LWOFF M. et CATHALA F. - Influence de l'hypo- et de l'hyperthermie sur l'évolution de la poliomyélite de la souris. Relation entre neurovirulence et thermorésistance du développement viral.
C.R. Acad. Sci. - 1960 - 250 - 2644-2645.
- 88 PEROL-VAUCHEZ Y., TOURNIER P. et LWOFF M. - Atténuation de la virulence du virus de l'encéphalomyélocardite de la souris par culture à basse température. Influence de l'hypo- et de l'hyperthermie sur l'évolution de la maladie expérimentale.
C.R. Acad. Sci. 1961 - 253 - 2164-2166.
- 89 INOUE Y.K. and KATO H. - Studies on japanese B encephalitis virus. V. A thermoefficient mutant of japanese B encephalitis virus.
Virology - 1963 - 21 - 222-225.

- 90 BROWN A. - Differences in maximum and minimum plaque forming temperatures among selected group A arboviruses.
Virology - 1963 - 21 - 362-372.
- 91 PRUNET P. - Modifications du comportement des virus aphteux lors des passages successifs en culture de tissu à diverses températures. Recherche de mutants "froids".
Ann. Inst. Past. - 1964 - 106 - 18-28.
- 92 ASSO J., AYNAUD J.M. et PLART M.F. - Etude de mutants de virus aphteux obtenus par culture à basse température. Sélection de souches non pathogènes pour le porc.
Ann. Inst. Past. - 1966 - 110 - 233-243.
- 93 LWOFF A. et LWOFF M. - L'inhibition du développement du virus poliomyélitique à 39° et le problème du rôle de l'hyperthermie de l'évolution des infections virales.
C.R. Acad. Sci. - 1958 - 246 - 190-192.
- 94 JOHNSON J. - The relation of air temperature to certain plant diseases.
Phytopathology - 1921 - 11 - 446-458.
- 95 JOHNSON J. - The relation of air temperature to the mosaic disease of potatoes and other plants.
Phytopathology - 1922 - 12 - 438.
- 96 KUNKEL L.O. - Heat treatment for the cure of yellow and other virus diseases of peach.
Phytopathology - 1936 - 26 - 809.
- 97 KASSANIS B. - Heat-therapy of virus infected plants.
Ann. Appl. Biol. - 1954 - 41 - 470-474.
- 98 KASSANIS B. - Some effects of varying temperature on the quality and quantity of tobacco mosaic virus in infected plants.
Virology - 1957 - 4 - 187-199.
- 99 KASSANIS B. - Effects of changing temperature on plant virus diseases.
Advan. Virus Res. - 1957 - 4 - 221-241.
- 100 WOLF H.F. - Prevention of poliomyelitis in monkeys by means of hyperpyrexia.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1935 - 32 - 1083-1087.

- 101 LILLIE R.D., DYER R.E. and ARMSTRONG C. - Seasonal variation in intensivity of brain reaction of the St. Louis encephalitis in mice and of endemic typhus in guinea pigs.
Public Health Rep. - 1937 - 52 - 1805-1822.
- 102 ARMSTRONG C - Studies on the mechanism of experimental intranasal infection in mice.
Public Health Rep. - 1938 - 53 - 2004-2012.
- 103 THOMPSON R.L. - The influence of temperature upon proliferation of infectious fibroma and infectious myxoma viruses in vivo.
J. Infect. Dis. - 1938 - 62 - 307.
- 104 THOMPSON R.L. and PARKER - The effect of high external temperature on infectious myxoma of rabbits.
J. Bactériol - 1941 - 41 - 53.
- 105 ARMSTRONG C. - Some recent research in the field of neurotropic viruses with special reference to lymphocytic choriomeningitis and herpes simplex.
The military Surgeon - 1942 - 91 - 129-146.
- 106 SULKIN S. ED. - The effect of environmental temperature on experimental influenza in mice.
J. Immunol. - 1945 - 51 - 291.
- 107 METCALF T.G. - The influence of cold on virus infectivity.
in "Influence of cold on host-parasite interactions" - 1963 - Part. III - 343 - Ed. E.G. Viereck.
- 108 WALKER D.L. and BORING D. - Factors influencing host-virus interaction. III. Further studies on the alteration of coxsackie virus infection in adult mice by environmental temperature.
J. Immunol. - 1958 - 80 - 39-44.
- 109 MARSHALL I.D. - The influence of ambient temperature on the course of myxomatosis in rabbits.
J. Hyg. - 1959 - 57 - 484.
- 110 LWOFF A., TCURNIER P. et CARTEAUD J.P. - L'influence de l'hyperthermie provoquée sur l'infection poliomyélitique de la souris.
C.R. Acad. Sci. - 1959 - 248 - 1876-1878.

- 111 KIRN A., DAMMRON A., BRAUNWALD J. et WURTZ R. - Relation entre la fièvre et la survie des lapins infectés avec le virus vaccinal. C.R. Acad. Sci. - 1965 - 261 - 1923-1925.
- 112 KIRN A., DAMMRON A., BRAUNWALD J., LAB M. et WURTZ R. - Rôle de la fièvre dans la pneumonie vaccinale du lapin. Etude comparée du développement viral "in vivo" chez les animaux fébriles et apyrétiques. Ann. Inst. Past. - 1966 - 110 - 697-706.
- 113 KIRN A., SCHIEFFER K. et BRAUNWALD J. - L'hyperthermie provoquée au cours de l'encéphalite à virus vaccinal de la souris. Mécanisme de son action. Ann. Inst. Past. - 1966 - 111 - 645-654.
- 114 JOKLIK W.K. - The intracellular uncoating of poxvirus DNA. I. The fate of radioactively - labeled rabbitpox virus. J. Mol. Biol. - 1964 - 8 - 263-276.
- 115 JOKLIK W.K. - The intracellular uncoating of poxvirus DNA. II. The molecular basis of the uncoating process. J. Mol. Biol. - 1964 - 8 - 277-288.
- 116 WOODSON B. - Recent progress in poxvirus research. Bacteriol. Rev. - 1968 - 32 - 127-137.
- 117 KATES J.R. and MAC AUSLAN B.R. - Poxvirus DNA dependent RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. - 1967 - 58 - 134-141.
- 118 MUNYON W., PAOLETTI E. and GRACE J.T. - RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. Proc. Natl. Acad. Sci. - 1967 - 58 - 2280-2288.
- 119 SALZMAN N.P., SHATKIN A.J. and SEBRING E.D. - Viral protein and DNA synthesis in vaccinia virus infected Hela cell cultures. Virology - 1963 - 19 - 542-550.
- 120 SHATKIN A.J. - The formation of vaccinia virus protein in the presence of 5-fluorodeoxyuridine. Virology - 1963 - 20 - 292-301.

- 121 SALZMAN N. P., SHATKIN A. J., SEBRING E. D. and MUNYON W. - On the replication of vaccinia virus.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology - 1962 - 27 - 237-244.
- 122 BRAUNWALD J. et KIRN A. - Influence des températures supra-optimales sur le développement du virus vaccinal en cultures cellulaires. III. Etude cytologique de la synthèse des antigènes viraux.
Ann. Inst. Past. - 1967 - 112 - 495-503.
- 123 WAROCQUIER R. et SAMAILLE J. - Action de l'actinomycine D, de la puromycine et de la p-fluorophénylalanine sur la phase thermosensible du cycle de multiplication de l'adénovirus 5.
C.R. Acad. Sci. - 1968 - 266 - 2513-2515.
- 124 ARHELGER R. B. and RANDALL C. C. - Electron microscopic observations on the development of fowl poxvirus in chorioallantoic membrane.
Virology - 1964 - 22 - 59-66.
- 125 BERNHARD W., BAUER A., HAREL J. et OBERLING C. - Les formes intracytoplasmiques du virus fibromateux de Shope. Etudes des coupes ultrafines au microscope électronique.
Bull. Cancer - 1955 - 41 - 423-444.
- 126 DALES S. - Relation between penetration of vaccinia, release of viral DNA and initiation of genetic functions. Perspectives in Virology IV - 1965 - 4 - 47-71.
- 127 DALES S. and SIMINOVITCH L. - The development of vaccinia virus in Earle's L strain cells as examined by electron microscopy.
J. Biophys. Biochem. Cytol. - 1961 - 10 - 475-502.
- 128 DOURMASHKIN R. and BERNHARD W. - A study with electron microscope of the skin tumor of molluscum contagiosum.
J. Ultrastruct. Res. - 1959 - 3 - 11-38.
- 129 GAYLORD W. H. and MELNICK J. L. - Intracellular forms of poxviruses as shown by the electron microscope.
J. Exp. Med. - 1954 - 98 - 157-171.

- 130 KAJIOKA R., SIMINOVITCH L. and DALES S. - The cycle of multiplication of vaccinia virus in Earle's strain L cells. II. Initiation of DNA synthesis and morphogenesis.
Virology - 1964 - 24 - 295-309.
- 131 MORGAN C., ELLISON S.A., ROSE H.M. and MOORE D.H. - Structure and development of viruses observed in the electron microscope. II. Vaccinia and fowl pox viruses.
J. Exp. Med. - 1954 - 100 - 301-309.
- 132 PATRIZI G. and MIDDELKAMP J.N. - Immature forms of vaccinia virus. Morphological observations from thin sections of infected human skin.
Virology - 1968 - 34 - 189-191.
- 133 PETERS D. - Morphologie Menschen und Tier pathogener Viren.
Zentz. Bact. Parasitenkun. Infektionskrankh u. Hyg. - 1959 - 176 - 259-294.
- 134 SCHERRER R. - Morphogénèse et ultrastructure du virus fibromateux de Shope.
Pathol. Microbiol. - 1968 - 31 - 129-146.
- 135 HUXSOLL D., KAJIMA M. and POLLARD M. - Induction of latent poxvirus infection in monkey kidney tissue culture cells.
Bact. Proc. - 1964 - 145.
- 136 LEBEURIER G. et HIRTH L. - Action des températures supra-optimale sur la multiplication du virus de la mosaïque du tabac dans des disques de feuilles disposés en milieu liquide. Etude des propriétés des virions.
C.R. Acad. Sci. - 1964 - 259 - 2563-2566.
- 137 STARR T.J., KAJIMA M. and HOLTERMANN O.A. - Effects of actinomycin and puromycin on the cytochemical-staining characteristics of vaccinia infected cells.
Texas Rep. Biol. Med. - 1967 - 25 - 281-293.
- 138 JOKLIK W.K. and BECKER Y. - The replication and coating of vaccinia virus.
J. Mol. Biol. - 1964 - 10 - 452-474.

- 139 GIRGIS A. et VIEUCHANGE J. - Incorporation de thymidine radioactive dans des cellules de mammifères cultivées "in vitro".
Ann. Inst. Past. - 1964 - 106 - 29-47.
- 140 TERRINHA A., VIGARIO J., PETISCA J., MOURA NUNES J. and BASTOS A. - Autoradiographic study on sheeppox virus infection.
J. Bacteriol. - 1965 - 90 - 1703-1709.
- 141 JOFTES D.L. and WARREN S. - Simplified liquid emulsion radioautography.
J. Biol. Photogr. Ass. - 1955 - 23 - 145-150.
- 142 MESSIER B. and LEBLOND C.P. - Preparation of coated radioautographs by dipping sections in fluid emulsion.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1957 - 96 - 7-10.
- 143 DILWORTH C.C., OCCHIALINI G.P.S. and VERMAESEN L. - On proceeding nuclear emulsion. I. Concerning temperature development.
Bull. Centre Phys. Nucl. Univ. Libre - Bruxelles - 1950 - 13a - 1-16.
- 144 WARNER J.R., KNOFF P.M. and RICH A. - A multiple ribosomal structure in protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. - 1963 - 49 - 122-129.
- 145 DOUNCE A.L. - The isolation and composition of cell nucleic and nucleoli.
In "The nucleic acids" Ed. by E. Chargaff and J.N. Davidson - Academic Press - New-York - 1955 - 2 - 93.
- 146 HANAFUSA T. - Alteration of nucleic acid metabolism of host cells by active and inactivated forms of vaccinia virus.
Biken's J. - 1960 - 3 - 313-328.
- 147 FURLONG N.B. - A rapid assay for nucleotide kinase using ^{14}C or ^3H -labeled nucleotides.
Analyt. Biochem. - 1963 - 5 - 515-522.
- 148 WARBURG O. und CHRISTIAN W. - Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase.
Biochem. Zeitschrift - 1941 - 310 - 384-421.

- 149 JUNGWIRTH C and JOKLIK W.K. - Studies on "early" enzymes in HeLa cells infected with vaccinia virus.
Virology - 1965 - 27 - 80-93.
- 150 MARMUR J. - A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms.
J. Mol. Biol. - 1961 - 3 - 208-218.
- 151 MAC AUSLAN B.R. and KATES J.R. - Poxvirus induced acid deoxyribonuclease: regulation of synthesis; control of activity in "vivo"; purification and properties of the enzyme.
Virology - 1967 - 33 - 709-716.
- 152 KATES J.R. and MAC AUSLAN B.R. - Relationship between protein synthesis and viral deoxyribonucleic acid synthesis.
J. of Virology - 1967 - 1 - 110-114.
- 153 GUIR J. - Etude autoradiographique du développement du virus de la vaccine à températures optimale et supra-optimale.
Thèse de Doctorat en Médecine - Strasbourg - 1967 -
- 154 BURKARD G., BRAUNWALD J., GUIR J., BRENDDEL A. et KIRN A. - Développement du virus vaccinal sur cellules rénales de fœtus de veau à températures optimale et supra-optimale. II. Etude cinétique de la synthèse de l'ADN viral.
Ann. Inst. Past. - 1968 - 115 - 1018-1028.
- 155 GUIR J., BRENDDEL A., BRAUNWALD J., BURKARD G. et KIRN A. - Développement du virus vaccinal sur cellules rénales de fœtus de veau à températures optimale et supra-optimale. I. Etude autoradiographique.
Ann. Inst. Past. - 1968 - 115 - 465-477.
- 156 JUNGWIRTH C. and DAWID I.B. - Vaccinia DNA: separation of viral from host cell DNA.
Arch. Ges. Virusforsch. - 1967 - 20 - 464-468.
- 157 MAGEE W.E. and MILLER O.V. - Immunological evidence for the appearance of a new DNA polymerase in cells infected with vaccinia virus.
Virology - 1967 - 31 - 64-69.
- 158 CAIRNS M.J.F. - The initiation of vaccinia infection.
Virology - 1960 - 11 - 603-623.

- 159 KATO S., OGAWA M. and MIYAMOTO H. - Nucleocytoplasmic interaction in pox-virus infected cells. I. Relationship between inclusion formation and DNA metabolism of the cells.
Biken's J. - 1964 - 7 - 45-56.
- 160 KIT S., DUBBS D.R. and HSU T.C. - Biochemistry of vaccinia - infected mouse fibroblasts (strain L-M). III. Radioautographic and biochemical studies of thymidine ³H uptake into DNA of L-M cells and rabbit cells in primary culture.
Virology - 1963 - 19 - 13-22.
- 161 SHEEK M. and MAGEE W.E. - An autoradiographic study on the intracellular development of vaccinia virus.
Virology - 1961 - 15 - 146-163.
- 162 BASILICO C. and JOKLIK W.K. - Studies on a temperature - sensitive mutant of vaccinia virus strain WR.
Virology - 1968 - 36 - 668-677.
- 163 FISZMAN M.Y., MENARD-BUCCHINI D. et LWOFF A. - Intervention d'une nucléase dans l'action inhibitrice des températures supra-optimales sur le développement d'un poliovirus.
C.R. Acad. Sci. - 1968 - 266 - 1342-1344.
- 164 SCHERRER R., KIRN A. et BRAUNWALD J. - Influence des températures supra-optimales sur le développement du virus vaccinal en cultures cellulaires. II. Etude cytologique de la synthèse de l'ADN viral.
Ann. Inst. Past. - 1965 - 108 - 413-422.
- 165 DOLLE G. - Replication du DNA viral en fonction de la température et du système cellulaire. Etude autoradiographique du développement d'un mutant "chaud" du virus vaccinal et du virus du carcinome rénal de la grenouille (FV₃)
Thèse de Doctorat en Médecine - Strasbourg - 1969.
- 166 WEIL R., PETURSSON G., KÁRA J. and DIGGELMANN H. - On the interaction of polyoma virus with the genetic apparatus of host cells. in "The Molecular Biology of Viruses" - Ed. J.S. Colter and W. Paranchych. - Academic Press - New-York - London - 1967 - 593-626.
- 167 TRAUT R.Q. and MONRO R.E. - The puromycin reaction and its relation to protein synthesis.
J. Mol. Biol. - 1964 - 10 - 63-72.

- 168 MUNIER R. et COHEN G.N. - Incorporation d'analogues structuraux d'acides aminés dans les protéines bactériennes au cours de leur synthèse *in vivo*.
Biochem. Biophys. Acta. - 1959 - 31 - 378-391.
- 169 JOKLIK W.K. - The multiplication of poxvirus DNA.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology - 1962 - 27 - 199-208.
- 170 KATES J.R. and MAC AUSLAN B.R. - Messenger RNA synthesis by a "coated" viral genome.
Proc. Natl. Acad. Sci. - 1967 - 57 - 314-320.
- 171 MUNYON W. and KIT S. - Induction of cytoplasmic ribonucleic acid (RNA) synthesis in vaccinia- infected LM cells during inhibition of protein synthesis.
Virology - 1966 - 29 - 303-309.
- 172 WOODSON B. - Vaccinia mRNA synthesis under conditions which prevent uncoating.
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1967 - 27 - 169-175.
- 173 KEIR H.M. - Virus induced enzymes in mammalian cells infected with DNA viruses.
In "The Molecular Biology of Viruses" - Ed. by L.V. Crawford and M.G.P. Stocker - London-Cambridge - University Press. - 1968 - 67-99.
- 174 KIT S. and DUBBS D.R. - Augmentation of enzyme activities in virus infected animal cells.
In "Enzyme Induction by Viruses" - Monographs in Virology - Basel - 1969 - 37-51.
- 175 MAGEE W.E. - DNA polymerase and deoxyribonucleotide kinase activities in cells infected with vaccinia virus.
Virology - 1962 - 17 - 604-607.
- 176 MAC AUSLAN B.R. and JOKLIK W.K. - Stimulation of the thymidine phosphorylating system in HeLa cells on infection with pox virus.
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1962 - 8 - 486-491.

- 177 MAC AUSLAN B.R. - Control of induced thymidine kinase activity in the poxvirus-infected cell.
Virology - 1963 - 20 - 162-168.
- 178 MAC AUSLAN B.R. - The induction and repression of thymidine kinase in the poxvirus infected HeLa cell.
Virology - 1963 - 21 - 383-389.
- 179 KIT S., DUBBS D.R. and PIEKARSKI L.J. - Enhanced thymidine phosphorylating activity of mouse fibroblasts (strain L-M) following vaccinia infection.
Biochem. Biophys. Res. - 1962 - 8 - 72-75.
- 180 DUBBS D.R. and KIT S. - Isolation and properties of vaccinia mutants deficient in thymidine kinase-inducing activity.
Virology - 1964 - 22 - 214-225.
- 181 MUNYON W. and KIT S. - Induction of thymidine kinase formation in LM (TK⁻) cells simultaneously infected with vaccinia and a thymidine kinaseless vaccinia mutant.
Virology - 1965 - 26 - 374-377.
- 182 KIT S. and DUBBS D.R. - Properties of deoxythymidine kinase partially purified from non-infected and virus- infected mouse fibroblast cells.
Virology - 1965 - 26 - 16-27.
- 183 RICCERI G. and COCUZZA G. - Activity of thymidine kinase in mouse embryo cells infected with polyoma virus.
Nature - 1967 - 214 - 191-192.
- 184 KLEMPERER H.G. , HAYNES G.R. , SHEDDEN W.I.H. and WATSON D.H. - A virus specific thymidine kinase in BHK₂₁ cells infected with herpes simplex virus.
Virology - 1967 - 31 - 120-128.
- 185 HAMADA C., KAMIYA T. and KAPLAN A. - Serological analysis of some enzymes present in pseudorabies virus-infected and non infected cells.
Virology - 1966 - 28 - 271-281.
- 186 KEIR H.M. and GOLD E. - Desoxyribonucleic acid nucleotidyltransferase and desoxyribonuclease from cultured cells infected with herpes simplex virus.
Biochem. Biophys. Acta - 1963 - 72 - 263-276.

- 187 GREEN M., PINA M. and CHAGOYA V. - Biochemical studies on adenovirus multiplication. V. Enzymes of desoxyribonucleic acid synthesis in cells infected by adenovirus and vaccinia virus. J. Biol. Chem. - 1964 - 239 - 1188-1197.
- 188 KIT S., PIEKARSKI L.J. , DUBBS D.R., TORRES R.A. and ANKEN M. Enzyme induction in green monkey kidney cultures infected with simian adenovirus. J. of Virology - 1967 - 1 - 10-15.
- 189 LEDINKO N. - Enhanced desoxyribonucleic acid polymerase activity in human embryonic kidney cultures infected with adenovirus 2 or 12. J. of Virology - 1968 - 2 - 89-98.
- 190 SHEEK M.R. - DNA polymerase in mammalian cells. Influence of adenovirus type 2 on the distribution in nuclear and cytoplasmic extracts. Texas Rep. Biol. Med. - 1966 - 24 - 479-488.
- 191 GREEN M. and PINA M. - Stimulation of the DNA synthesizing enzymes of cultured human cells by vaccinia virus infection. Virology - 1962 - 17 - 603-604.
- 192 JOKLIK W.K. , JUNGWIRTH C., ODA K. and WOODSON B. - Early and late functions during the vaccinia virus multiplication cycle. In "The Molecular Biology of Viruses" - Ed. by J.S. Colter and W. Paranchych - Academic press - New-York - London - 1967 - 473-494.
- 193 MAC AUSLAN B.R. and KUCHERA L. - DNA polymerase activity in FV infected BHK cells. Virology - 1968 - 35 - 328-330.
- 194 GREEN M. - Biosynthetic modifications induced by DNA animal viruses. Ann. Rev. Microbiol. - 1966 - 20 - 189-222.
- 195 MAGEE W.E. and MILLER O.V. - Evidence for the viral specific nature of the DNA polymerase formed in cells infected with vaccinia virus. Federation Proc. - 1966 - 25 - 652.
- 196 KAMIYA T., BEN-PORAT T. and KAPLAN A.S. - Control of certain aspects of the infective process by progeny viral DNA. Virology - 1965 - 26 - 577-589.

- 197 BEDSON H.S. and CRUICKSHANK J.G. - The relation of the DNA polymerase to an early temperature-sensitive event in the replication of variola virus.
J. Gen. Virol. - 1969 - 4 - 413-422.
- 198 OLESON A.E. and KOERNER J.F. - A desoxyribonuclease induced by infection with bacteriophage T₂.
J. Biol. Chem. - 1964 - 239 - 2935-2943.
- 199 PRICER W.E. and WEISSBACH A. - The synthesis of deoxyribonucleic acid exonucleases associated with the formation of temperate inducible bacteriophages.
J. Biol. Chem. - 1967 - 242 - 1701 - 1704.
- 200 TRILLING D.M. and APOSHIAN H.V. - A desoxyribonuclease found after infection of Bacillus subtilis with phage SP₃.
Proc. Natl. Acad. Sci. - 1965 - 54 - 622-628.
- 201 MAC AUSLAN B.R. - Deoxyribonuclease activity of normal and poxvirus infected HeLa cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1965 - 19 - 15-20.
- 202 MAC AUSLAN B.R., HERDE P., PETT D. and ROSS J. - Nucleases of virus infected animal cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1965 - 20 - 586-591.
- 203 ERON L.J. and MAC AUSLAN B.R. - The nature of poxvirus-induced deoxyribonucleases.
Biochem. Biophys. Res. Comm. - 1966 - 22 - 518-523.
- 204 LEHMAN I.R. - Deoxyribonucleases : their relationship to deoxyribonucleic acid synthesis.
Ann. Rev. Biochem. - 1967 - 36 - 645-668.
- 205 MAC AUSLAN B.R. and KATES J.R. - Regulation of virus-induced deoxyribonucleases.
Proc. Natl. Acad. Sci. - 1966 - 55 - 1581-1587.
- 206 WEISS B. and RICHARDSON C.C. - Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. I. Repair of single-strand breaks in DNA by an enzyme system from Escherichia coli infected with T₄ bacteriophage.
Proc. Natl. Acad. Sci. - 1967 - 57 - 1021.



R E F E R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

(par ordre alphabétique)

Les numéros qui suivent chaque nom d'auteur correspondent aux références bibliographiques données dans le chapitre précédent.



- A -

ALLISON A. C. - 23.
ANDERSON S. G. - 56.
ANKEN M. - voir KIT S. - 188.
APOSHIAN H. V. - v. TRILLING D. M. - 200.
APPLEYARD G. - 33 - 35 - 36.
- v. WESTWOOD J. C. N. - 12 - 34.
ARHELGER R. B. - 124.
ARMSTRONG C. - 51 - 102 - 105.
- v. LILLIE R. D. - 101.
ASSO J. - 92.
MAC AUSLAN B. R. - 151 - 176 - 177 - 178 - 193 - 201 - 202 - 205.
- v. ERON L. J. - 203.
- v. KATES J. R. - 117 - 152 - 170.
AYNAUD J. M. - v. ASSO J. - 92.

- B -

BASILICO C. - 162.
BASTOS A. - v. TERRINHA A. - 140.
BAUER A. - v. BERNHARD W. - 125.
BEAUTEMS R. - 76.
BECKER Y. - v. JOKLIK W. K. - 138.
BEDSON H. S. - 9 - 197. -
- v. CRUICKSHANK J. G. - 69.
BEN-PORAT T. - v. KAMIYA T. - 196.
BENSCH K. G. - v. GORDON G. B. - 46.
BERNHARD W. - 125.
- v. DOURMASHKIN R. - 128.
BORING D. - v. WALKER D. L. - 108.
BOUDREAULT A. - 75.
BRAUNWALD J. - 122.
- v. BURKARD G. - 154.
- v. GUIR J. - 155.
- v. KIRN A. - 43 - 44 - 111 - 112 - 113.
- v. SCHERRER R. - 164.
BRENDDEL A. - v. BURKARD G. - 154.
- v. GUIR J. - 155.
BRIODY B. A. - 55.
BROWN A. - 90.

BURKARD G. - 154.
- v. GUIR J. - 155.
BURKE D. C. - v. ALLISON A. C. - 23.
BURNET F. M. - 6.

- C -

CAIRNS H. J. F. - 158.
CARTEAUD J. P. - v. LWOFF A. - 110.
CATHALA F. - v. LWOFF A. - 87.
CHAGOYA V. - v. GREEN M. - 187.
CHAPIN M. - v. DUBES G. R. - 84.
CHRISTIAN W. - v. WARBURG O. - 148.
COATES M. S. - v. THOMPSON R. L. - 8.
COCUZZA G. - v. RICCERI G. - 183.
COHEN G. N. - v. MUNIER R. - 168.
CRAWFORD G. N. C. - 58.
MAC CREA J. F. - v. PFAU C. J. - 25.
CRUICKSHANK J. G. - 69.
- v. BEDSON H. S. - 197.

- D -

DALES S. - 11 - 126 - 127.
- v. KAJIOKA R. - 130.
DAMMRON A. - v. KIRN A. - 111 - 112.
DAWID I. B. - v. JUNGWIRTH C. - 156.
DIGGELMANN H. - v. WEIL R. - 166.
DILWORTH C. C. - 143.
DOLLE G. - 165.
DOUNCE A. L. - 145.
DOURMASHKIN R. - 128.
DUBBS D. R. - 180.
- v. KIT S. - 40 - 160 - 174 - 179 - 182 - 188.
DUBES G. R. - 84 - 85.
DUBOS R. J. - v. SMADEL J. E. - 19.
DUMBELL K. R. - v. BEDSON H. S. - 9.
DYER R. E. - v. LILLIE R. D. - 101.

- E -

EAGLE H. - 39 - 41.
EARLE R. - 42.
EASTERBROOK K. B. - 13 - 63.
ELLISON S. A. - v. MORGAN C. - 131.
ENDERS J. F. - 7.
ERON L. J. - 203.

- F -

FENNER F. - 38.
- v. WOODROOFE G. M. - 32.
FIZMAN M. Y. - 163.
FURLONG N. B. - 147.
FURNESS G. - 61.

- G -

GAFFORD L. G. - v. HYDE J. M. - 24.
GAYLORD W. H. - 129.
GEVAUDAN P. - 66.
GIRGIS A. - 139.
GOLD E. - v. KEIR H. M. - 186
GORDON G. B. - 46.
GRACE J. T. - v. MUNYON W. - 118.
GREEN M. - 187 - 191 - 194.
GROMAN N. - 50 - 81.
GUIR J. - 153 - 155.
- v. BURKARD G. - 154.

- H -

HAMADA C. - 185.
HANAFUSA T. - 146.
HAREL J. - v. BERNHARD W. - 125.
HARRIS W. J. - v. WESTWOOD J. C. N. - 12.
- v. ZWARTOUW H. T. - 30.
HAYNES G. R. - v. KLEMPERER H. G. - 184.
HERDE P. - v. MAC AUSLAN B. R. - 202.

HIRTH L. - v. LEBEURIER G. - 73 - 74 - 82 - 136.
HOAGLAND C.L. - 14 - 15 - 16 - 17 - 18.
HOLM S.E. - v. MARQUARDT J. - 31.
HOLOWCZAK J.A. - 28 - 29.
HOLTERMANN O.A. - v. STARR T.J. - 137.
HSU T.C. - v. KIT S. - 40 - 160.
HUXSOLL D. - 135.
HYDE J.M. - 24.

- I -

INOUE Y.K. - 89

- J -

JACKSON N.L. - v. STEVENS J.G. - 68.
JOFTES D.L. - 141.
JOINSON J. - 94 - 95.
JOKLIK W.K. - 20 - 26 - 27 - 114 - 115 - 138 - 169 - 192.
 - v. MAC AUSLAN B.R. - 176.
 - v. BASELICO C. - 162.
 - v. HOLOWCZAK J.A. - 28 - 29.
 - v. JUNGWIRTH C - 149.
JUNGWIRTH C. - 149 - 156.
 - v. JOKLIK W.K. - 192.

- K -

KAJIMA M. - v. HUXSOLL D. - 135.
 - v. STARR T.J. - 137.
KAJIOKA R. - 130.
KAMIYA T. - 196.
 - v. HAMADA C. - 185.
KAPLAN A. - v. HAMADA C. - 185.
 - v. KAMIYA T. - 196.
KÁRA J. - v. WEIL R. - 166.
KASSANIS B. - 97 - 98 - 99.
KATES J.R. - 117 - 152 - 170.
 - v. MAC AUSLAN B.R. - 151 - 205.

KATO S. - 159.
- v. INOUE Y.K. - 89.
KEIR H.M. - 173 - 186.
KIRN A. - 43 - 44 - 111 - 112 - 113.
- v. BRAUNWALD J. - 122.
- v. BURKARD G. - 154.
- v. GUIR J. - 155.
- v. LAB M. - 77.
- v. SCHERRER R. - 164.
KIT S. - 40 - 160 - 174 - 179 - 182 - 188.
- v. DUBBS D.R. - 180.
- v. MUNYON W. - 171 - 181.
KLEMPERER H.G. - 184.
KNOPF P.M. - v. WARNER J.R. - 144.
KOERNER J.F. - v. OLESON A.E. - 198.
KUCHERA L. - v. MAC AUSLAN B.R. - 193.
KUNKEL L.O. - 96.

- L -

LAB M. - 67 - 77.
- v. KIRN A. - 112.
LAVIN G.I. - v. HOAGLAND C.L. - 15.
- v. SMADEL J.E. - 19.
LEBEURIER G. - 70 - 71 - 72 - 73 - 74 - 82 - 136.
LEBLOND C.P. - v. MESSIER B. - 142.
LEDINKO N. - 189.
LEHMAN I.R. - 204.
LILLIE R.D. - 101.
- v. ARMSTRONG C. - 51.
LUFT J.H. - 48.
LUSH D. - v. BURNET F.M. - 6.
LWOFF A. - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 52 - 53 - 79 - 80 - 83 - 87 - 93 -
- 110.
- v. FIZMAN M.Y. - 163.
- v. GROMAN N. - 50.
- v. SABIN A. - 86.
LWOFF M. - v. GROMAN N. - 50.
- v. LWOFF A. - 3 - 4 - 5 - 52 - 79 - 80 - 83 - 87 - 93.
- v. PEROL-VAUCHEZ Y. - 88.
LYCKE E. - v. MARQUARDT J. - 31.

- M -

- MAGEE W.E. - 157 - 175 - 195.
- v. SHEEK M. - 161.
MAGRATH D.I. - v. MAITLAND H.B. - 59.
MAITLAND H.B. - 57 - 59.
MARMUR J. - 150.
MARQUARDT J. - 31.
MARSHALL I.D. - 109.
MELNICK J.L. - v. GAYLORD W.H. - 129.
MENARD-BUCCHINI D. - v. FIZMAN M.Y. - 163.
MESSIER B. - 142.
METCALF T.G. - 107.
MICHEL J.B. - 78.
MIDDELKAMP J.N. - v. PATRIZI G. - 132.
MILLER L.R. - v. GORDON G.B. - 46.
MILLER O.V. - v. MAGEE W.E. - 157 - 195.
MILLONIG G. - 47.
MIYAMOTO H. - v. KATO S. - 159.
MONRO R.E. - v. TRAUT R.Q. - 167.
MOORE D.H. - v. MORGAN C. - 131.
MORGAN C. - 131.
MOURA NUNES J. - v. TERRINHA A. - 140.
MUENCH H. - v. REED L.J. - 45.
MÜLLER D. - 10.
MUNIER R. - 168.
MUNYON W. - 118 - 171 - 181.
- v. SALZMAN N.P. - 121.

- O -

- OBERLING C - v. BERNHARD W. - 125.
OCCHIALINI G.P.S. - v. DILWORTH C.C. - 143.
ODA K. - v. JOKLIK W.K. - 192.
OGAWA M. - v. KATO S. - 159.
OLESON A.E. - 198.
OVERMAN J.R. - 60.

- P -

PAOLETTI E. - v. MUNYON W. - 118.
PARKER - v. THOMPSON R. L. - 104.
PATRIZI G. - 132.
PAVILANIS V. - v. BOUDREAULT A. - 75.
PEARSON H. E. - v. ENDERS J. F. - 7.
PEROL-VAUCHEZ Y. - 88.
PETERS D. - 133.
- v. MÜLLER D. - 10.
PETISCA J. - v. TERRINHA A. - 140.
PETT D. - v. MAC AUSLAN B. R. - 202.
PETURSSON G. - v. WEIL R. - 166.
PFAU C. J. - 25.
PICKELS E. G. - v. SMADEL J. F. - 22.
PIEKARSKI L. J. - v. KIT S. - 40 - 179 - 188.
PIÑA M. - v. GREEN M. - 187 - 191.
PLART M. F. - v. ASSO J. - 92.
POLLARD M. - v. HUXSOLL D. - 135.
PRICER W. E. - 199.
PRUNET P. - 91.

- R -

RANDALL C. C. - v. ARHELGER R. B. - 124.
- v. HYDE J. M. - 24.
REED L. J. - 45
REYNOLDS E. S. - 49.
RICCERI G. - 183.
RICH A. - v. WARNER J. R. - 144.
RICHARDSON C. C. - v. WEISS B. - 206.
RIVERS T. M. - v. HOAGLAND C. L. - 14 - 15 - 16 - 17 - 18.
- v. SMADEL J. F. - 22.
ROIZMAN B. - v. LWOFF A. - 52.
ROSE H. M. - v. MORGAN C. - 131.
ROSS J. - v. MAC AUSLAN B. R. - 202.

- S -

SABIN A. - 86.
SALZMAN N. P. - 54 - 119 - 121.

SAMAILLE J. - 65.
- v. WAROCQUIER R. - 123.
SANDERS F.K. - v. CRAWFORD G.N.C. - 58.
SCHERRER R. - 134 - 164.
SCHIEFFER K. - v. KIRN A. - 113.
SEBRING E.D. - v. SALZMAN N.P. - 119 - 121.
SHARP D.G. - v. SMITH K.O. - 62.
SHATKIN A.J. - 120.
- v. SALZMAN N.P. - 119 - 121.
SHEDDEN W.I.H. - v. KLEMPERER H.G. - 184.
SHEDLOVSKY T. - 37.
SHEEK M. - 161 - 190.
SIGURDSSON B. - 64.
SIMINOVITCH L. - v. DALES S. - 127.
- v. KAJIOKA R. - 130.
SMADEL J.E. - 19 - 22.
- v. HOAGLAND C.L. - 14 - 15 - 16 - 17 - 18.
- v. SHEDLOVSKY T. - 37.
SMITH K.O. - 62.
STANNARD C. - v. BRIODY B.A. - 55.
STARR T.J. - 137.
STEVENS J.G. - 68.
SULKIN S. ED. - 106.

- T -

TAMM I. - v. OVERMAN J.R. - 60.
TERRINHA A. - 140.
THOMPSON R.L. - 8 - 103 - 104.
TITMUSS D.H.J. - v. WESTWOOD J.C.N. - 12 - 34.
TOBIN B.H. - v. MAITLAND H.B. - 57.
TORRES R.A. - v. KIT S. - 188.
TOURNIER P. - v. LWOFF A. - 87 - 110.
- v. PEROL-VAUCHEZ Y. - 88.
TRAUT R.Q. - 167.
TRILLING D.M. - 200

- V -

VERMAESEN L. - v. DILWORTH C. C. - 143.
VIEUCHANGE J. - v. GIRGIS A. - 139.
VIGARIO J. - v. TERRINHA A. - 140.

- W -

WALKER D. L. - 108.
WARBURG O. - 148.
WARD S. M. - v. HOAGLAND C. L. - 16 - 17 - 18.
WARNER J. R. - 144.
WAROCQUIER R. - 123.
 - v. SAMAILLE J. - 65.
WARREN S. - v. JOFTES D. L. - 141.
WATSON D. H. - v. KLEMPERER H. G. - 184.
WEIL R. - 166.
WEISS B. - 206.
WEISSBACH A. - v. PRICER W. E. - 199.
WENNER H. A. - v. DUBES G. R. - 85.
WESTWOOD J. C. N. - 12 - 34.
 - v. APPLEYARD G. - 33 - 35 - 36.
 - v. ZWARTOUW H. T. - 30.
WOLF H. F. - 100.
WOODROOFE G. M. - 32.
WOODSON B. - 116 - 172.
 - v. JOKLIK W. K. - 192.
WURTZ R. - v. KIRN A. - 111 - 112.

- Y -

YOUNGNER J. S. - v. FURNESS G. - 61.

- Z -

ZWARTOUW H. T. - 21 - 30.
 - v. APPLEYARD G. - 35.
 - v. WESTWOOD J. C. N. - 12 - 34.



T A B L E D E S M A T I E R E S



INTRODUCTION

1

P R E M I E R E P A R T I E

THERMOSENSIBILITE DU DEVELOPPEMENT DE DIFFERENTES
SOUCHES DU VIRUS DE LA VACCINE

9

MATERIEL ET TECHNIQUES

10

I . Souches cellulaires

11

A. Souche KB

11

B. Souche L (TK⁻)

11

II. Milieux et solutions tampons

11

A. Milieu LaYe

11

B. Milieu LaYe 0

13

C. Milieu de Eagle

13

D. Milieu de conservation

15

E. Tampon sans ions Ca⁺⁺ ni Mg⁺⁺

16

F. Tampon phosphate - PBS

16

G. Solution de versénate de sodium 0,2 pour 1 000

17

H. Solution de trypsine 2 pour 1 000

17

I. Solution Earle-gélatine

17

J. Rouge neutre à 4 pour 1 000

18

K. Rouge de phénol à 10 pour 1 000

18

L. Antibiotiques

18

III. Matériel et techniques pour la culture des cellules KB

19

A. Verrerie

19

B. Entretien et repiquage des cellules

19

IV. Virus. Repiquage des souches	20
A. Souches d'origine	20
1. Souche VaMe	20
2. Souche WR	21
B. Conservation des souches	21
C. Repiquage des souches. Préparation des virus stock	21
V. Titrage des particules infectieuses	22
VI. Déroulement d'une expérience en cycle unique	22
VII. Inoculation aux animaux	23
A. Souris	23
B. Lapins	24
1. Pouvoir dermatrope	24
2. Pouvoir pneumotrope	24
VIII. Microscope électronique	24
RESULTATS	27
I. Etude du développement des souches d'origine en fonction de la température d'incubation	29
A. Cinétiques de développement des souches VaMe et WR à température optimale	29
B. Cinétiques de développement des souches VaMe et WR à températures supra-optimales	31
C. Cinétiques de développement des souches VaMe et WR à températures infra-optimales	33
II. Obtention de mutants thermosensibles et thermorésistants	36
A. Mutants thermosensibles ("froids")	36
B. Mutants thermorésistants ("chauds")	37
III. Caractères des mutants thermosensibles et thermorésistants	38
A. Thermosensibilité comparée des mutants "froids" et "chauds"	39

B.	Etude du pouvoir pathogène des mutants "froids" et "chauds" du virus vaccinal	46
1.	Neurovirulence de la souche WR d'origine et de ses mutants "froids" et "chauds" chez la souris	46
2.	Pouvoir pathogène pour le lapin	46
a)	Pouvoir dermo-infectieux	46
b)	Pouvoir pneumotrope	47
IV.	Détermination de la phase du développement viral sensible à la température	48
A.	Détermination de la durée de la phase primaire	49
B.	Thermosensibilité de la phase primaire	50
C.	Thermosensibilité de la phase secondaire	53
1.	Effet d'un transfert à 41°C sur la production des virions pendant la phase secondaire	53
2.	Etude comparée du blocage du développement du mutant "froid" par le FUDR et par un transfert à 41°C	53
3.	Etude morphologique en microscopie électronique du développement du mutant "froid" VaMe 25°/16 à températures optimale et supra-optimale	56
a)	Aspects morphologiques de l'infection des cellules KB à 36°C	56
b)	Aspects morphologiques de l'infection des cellules KB à 41°C	57
c)	Etude en microscopie électronique d'un transfert à température supra-optimale à différents moments du cycle	57
	DISCUSSION	59

DEUXIEME PARTIE

ETUDE DE L'INHIBITION DE LA REPLICATION DU DNA D'UN MUTANT "FROID" A TEMPERATURE SUPRA-OPTIMALE	77
MATERIEL ET TECHNIQUES	78
I. Souches cellulaires	79
II. Virus	79
III. Produits chimiques	79
IV. Corps radioactifs	80
V. Déroulement d'une expérience en autoradiographie	81
A. Ensemencement des tubes à lamelles	81
B. Technique de l'autoradiographie	81
C. Matériel microscopique et photographique	82
VI. Déroulement d'une expérience d'incorporation de thymidine radioactive	82
A. Ensemencement des tubes de Leighton	82
B. Détermination de l'incorporation de la thymidine marquée dans les fractions cytoplasmique et nucléaire des cellules	82
VII. Techniques utilisées pour l'étude des enzymes	84
A. Thymidine kinase	84
B. DNA polymérase	86
C. Désoxyribonucléases	87
1. Préparation du DNA radioactif	87
2. Désoxyribonucléases basique et neutre	88
3. Désoxyribonucléase acide	89

RESULTATS	91
I. Inhibition de la replication du DNA du mutant "froid" VaMe 25°/16 à température supra-optimale	93
A. Etude autoradiographique	93
B. Etude de la replication du DNA viral par incorporation de thymidine ¹⁴ C dans la fraction cytoplasmique des cellules infectées	95
1. Cinétiques de la synthèse du DNA viral à températures optimale et supra-optimale	95
2. Transferts à 41°C à différents moments de la phase primaire	96
II. Etude de la thermosensibilité des protéines précoces	99
A. Inhibition de la replication du DNA viral par adjonction de puromycine ou de fluorophénylalanine	101
B. Nécessité d'une nouvelle synthèse de protéines dans le cas d'un transfert de 41 à 36°C	101
C. Thermosensibilité des enzymes précoces	105
III. Etude de la synthèse et du fonctionnement à température supra-optimale des enzymes impliquées dans la replication du DNA du virus vaccinal	109
A. Synthèse et fonctionnement de la thymidine kinase à températures optimale et supra-optimale	109
1. Cinétiques de la synthèse de la thymidine kinase dans les cellules KB infectées et maintenues à 36 et à 41°C	109
2. Cinétiques de la synthèse de la thymidine kinase dans les cellules L (TK ⁻) infectées et maintenues à 36 et à 41°C	111
B. Synthèse et fonctionnement de la DNA polymérase virale à températures optimale et supra-optimale	114
1. Cinétique de la synthèse de la DNA polymérase à 36°C	114
2. Cinétiques comparées de la synthèse de la DNA poly- mérase à 36 et à 41°C	115
3. Fonctionnement "in vitro" de la DNA polymérase ex- traite du cytoplasme des cellules infectées incubées à 36 et à 41°C	115

C. Synthèse et fonctionnement des désoxyribonucléases	
à températures optimale et supra-optimale	118
1. Désoxyribonucléase neutre	118
2. Désoxyribonucléase basique	119
3. Désoxyribonucléase acide	120
 DISCUSSION	 125
 RESUME ET CONCLUSIONS	 141
 SUMMARY	 147
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 153
(par ordre d'arrivée dans le texte)	
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 177
(par ordre alphabétique)	

x
x x



